

TRABAJO FIN DE GRADO

**Grado en Ingeniería Biomédica**

**COMPARATIVA DE EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE  
PLASMA ATMOSFÉRICO PARA TERAPIA BIOMÉDICA**



**Memoria y Anexos**

<b>Autora:</b>	Ana Pan
<b>Directora:</b>	Dra. Cristina Canal Barnils
<b>Co-Directora:</b>	Dra. Aranzazu Villasante Bermejo
<b>Convocatoria:</b>	Febrero 2019



## Resumen

En los últimos años, la medicina de plasma ha sido un tema emergente de estudio e investigación en distintas áreas (esterilización, curación de heridas, tratamientos dentales), y muy especialmente en el área de terapias de cáncer. Estudios recientes han demostrado que las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que genera el plasma tienen un efecto selectivo y citotóxico en las células cancerígenas, sin afectar a las células sanas. Se han demostrado efectos letales del plasma en más de 20 líneas celulares *in vitro* e *in vivo*, y recientemente, en el grupo de investigación BBT, en cáncer de hueso.

El tratamiento plasma puede efectuarse de forma directa, aplicando directamente el plasma sobre el tumor o las células, de modo que todos los componentes del plasma interaccionan con el material biológico; o de forma indirecta, poniendo en contacto con el tumor o las células un medio líquido previamente tratado con plasma, de manera que únicamente las especies reactivas que se generan en el medio líquido interaccionan con el material biológico.

El objetivo principal de este proyecto es investigar los efectos directos e indirectos del plasma a presión atmosférica sobre dos líneas celulares de osteosarcoma, y estudiar dichos efectos tanto en 2D (células sembradas en placas de cultivo) como en 3D, haciendo crecer las células tumorales en andamios tridimensionales para mimetizar mejor el microambiente tumoral.

Para ello, se han caracterizado las especies reactivas ( $H_2O_2$ ,  $NO_2^-$ , y especies de tiempo de vida corto) generadas por el plasma atmosférico en medio de cultivo a diferentes tiempos de tratamiento. La concentración de especies en el medio aumenta progresivamente con el tiempo de tratamiento.

Para realizar el estudio del efecto del plasma en 3D, se han sintetizado nanopartículas de hidroxiapatita para incorporarlas a andamios de colágeno. Se ha analizado la degradación y capacidad de absorción de líquidos de los andamios con el fin de comprobar su aptitud para la siembra de células. Posteriormente se ha estudiado los efectos directos e indirectos del plasma sobre las células sembradas en los andamios.

Se ha comprobado que la concentración de especies reactivas que se generan es proporcional al tiempo de tratamiento, y en contraste con trabajos anteriores, se ha observado que la viabilidad de las células tratadas por plasma de manera indirecta no se ve afectada. Esto es debido a que se ha empleado medio de cultivo con piruvato, que actúa como *scavenger* de los peróxidos. Con el tratamiento directo sí que hay un ligero efecto citotóxico en las células, tanto en 2D como en 3D.



## Abstract

In recent years, plasma medicine has been an emerging topic of study and research in different areas (sterilization, wound healing, dental treatments), and especially in the area of cancer therapies. Recent studies have shown that the reactive oxygen and nitrogen species generated by plasma have a selective and cytotoxic effect on cancer cells, without affecting the healthy ones. Plasma lethal effects have been demonstrated in more than 20 cell lines in vitro and in vivo, and recently, in the BBT research group, in bone cancer.

The plasma treatment can be carried out directly, by applying directly the plasma on the tumour or the cells, so that all the components of the plasma interact with the biological material; or indirectly, by contacting the tumour or cells with a liquid medium previously treated with plasma, so that only the generated reactive species in the liquid medium interact with the biological material.

The main goal of this project is to investigate the direct and indirect effects of atmospheric pressure plasma generated on two osteosarcoma cell lines, and to study these effects both in 2D (cells seeded in culture plates) and in 3D, making the cancer cells grow in three-dimensional scaffolds to better mimic the tumour microenvironment.

To do so, reactive species ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  and short lived species) generated by atmospheric pressure plasma in culture medium at different treatment times have been characterized. The concentration of species in the environment increases progressively with the time of treatment.

To study the effect of plasma in 3D, hydroxyapatite nanoparticles have been synthesized to be incorporated into collagen. The degradation and swelling of the scaffolds have been analysed in order to check their suitability for cell seeding. Subsequently, the direct and indirect effects of the plasma on the cells seeded in the scaffolds have been studied.

It has been verified that the concentration of generated reactive species is proportional to the treatment time, and in contrast to previous work, it has been observed that the viability of cells treated by plasma indirectly is not affected. This is due to the use of culture medium with pyruvate, which acts as a scavenger for peroxides. With the direct treatment, there is a slight cytotoxic effect on the cells, both in 2D and 3D.



## Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a Maria Pau Ginebra y a la EEBE por darme la oportunidad de integrarme en el grupo de investigación de Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos y poder realizar el proyecto de fin de grado, dejando a mi disposición los laboratorios y material necesarios.

Quisiera también agradecer a Cristina Canal, por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su supervisión y ofrecerme ayuda, tiempo y dedicación a lo largo del proyecto.

Le agradezco a Aranzazu Villasante, por sus explicaciones y sugerencias, por la paciencia y disponibilidad durante los experimentos de laboratorio.

Gracias también a Montserrat Español, por su ayuda con las nanopartículas de hidroxiapatita.

Finalmente, me gustaría agradecer a todo el equipo de investigación de plasma por su amabilidad y por el apoyo recibido durante todo el transcurso del trabajo.





## Glosario

En este trabajo, para facilitar la lectura, se han utilizado los acrónimos más habituales empleados en la literatura que derivan de palabras inglesas.

APPJ	Atmospheric Pressure Plasma Jet (dispositivo de haz de plasma a presión atmosférica)
CAP	Cold Atmospheric Plasma (plasma atmosférico frío)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco)
GR	Griess Reagent
HANP	Hydroxyapatite nanoparticles (nanopartículas de hidroxiapatita)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
ROS	Reactive Oxygen and Nitrogen species (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno)





# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>VII</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.2. Estado del arte.....	1
1.2.1. Osteosarcoma.....	1
1.2.2. Plasma .....	1
1.2.3. Cultivo celular en 2D y 3D.....	5
1.3. Contexto del trabajo .....	6
1.4. Objetivos .....	6
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>9</b>
2.1. Dispositivo de plasma atmosférico .....	9
2.2. Líneas celulares.....	10
2.3. Tratamiento con haz de plasma atmosférico en 2D.....	10
2.3.1. Determinación de especies reactivas.....	10
2.3.2. Efectos del plasma atmosférico en cultivos celulares en 2D .....	14
2.4. Tratamiento con haz de plasma atmosférico en 3D.....	18
2.4.1. Síntesis de HANP .....	18
2.4.2. Síntesis de andamios de colágeno con HANP.....	22
2.4.3. Efectos del plasma atmosférico en cultivos celulares en 3D .....	24
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
3.1. Estudio del 2D.....	29
3.1.1. Tiras reactivas: aproximación a la concentración de especies reactivas .....	29
3.1.2. Generación de especies reactivas en DMEM por tratamiento con plasma .....	30
3.1.3. Efecto del tratamiento de plasma sobre la viabilidad celular de osteosarcoma en 2D .....	32
3.2. Estudio del 3D.....	35
3.2.1. Caracterización de las HANP mediante difracción de rayos X.....	35

3.2.2. Caracterización de los andamios.....	36
3.2.3. Efecto del tratamiento de plasma en células cultivadas en 3D.....	38
<b>4. ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL .....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>PRESUPUESTO Y/O ANÁLISIS ECONÓMICO .....</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>49</b>



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.2. Estado del arte

### 1.2.1. Osteosarcoma

El osteosarcoma, también llamado sarcoma osteogénico, es un tumor óseo cancerígeno cuya etiología sigue siendo en gran parte desconocida. Es caracterizado por la presencia de células mesenquimales malignas que afecta principalmente a los osteoblastos, produciendo hueso y/o sustancia osteoide (maduración anómala del tejido óseo). En el 75% de los casos se asienta sobre la metáfisis de los huesos largos [1].

Es el cáncer óseo que afecta de forma predominante a niños y adolescentes (entre los 13 y los 16 años de edad), coincidiendo con las etapas con mayor índice de crecimiento óseo. Representa, en los pacientes menores de 20 años, el 56% de todos los cánceres de hueso, con una incidencia de 400 casos nuevos cada año en Estados Unidos [2] [3].

Para su diagnóstico se requiere una biopsia y en la actualidad existen tres tipos de tratamiento: la quimioterapia (pre- y post-operatoria), la radioterapia y el tratamiento quirúrgico. Dependiendo del tipo de osteosarcoma que tenga el paciente se emplea un tratamiento o una combinación de ellos [3] [4].

Las terapias mencionadas anteriormente no son completamente efectivas, con una tasa relativa de supervivencia a 5 años de alrededor del 70 % [5]. Por ello es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que apunten a mejorar la tasa de supervivencia y de ser posible, ser la cura del osteosarcoma.

### 1.2.2. Plasma

El estado de la materia es el modo de agregación de las partículas de un cuerpo. Dependiendo de sus condiciones de temperatura o presión se pueden establecer cuatro fases diferentes: sólida, líquida, gaseosa y plasma, tal y como se muestra en la Figura 1.

El plasma se define como el cuarto estado de la materia y consiste en un gas total o parcialmente ionizado. Se genera con un gran aporte de energía a un gas neutro, el cual rompe las estructuras moleculares y forma partículas ionizadas y neutras con el mayor grado de libertad: una mezcla de iones positivos y negativos, electrones, moléculas y radicales neutros, radiación visible y ultravioleta [6] [7].



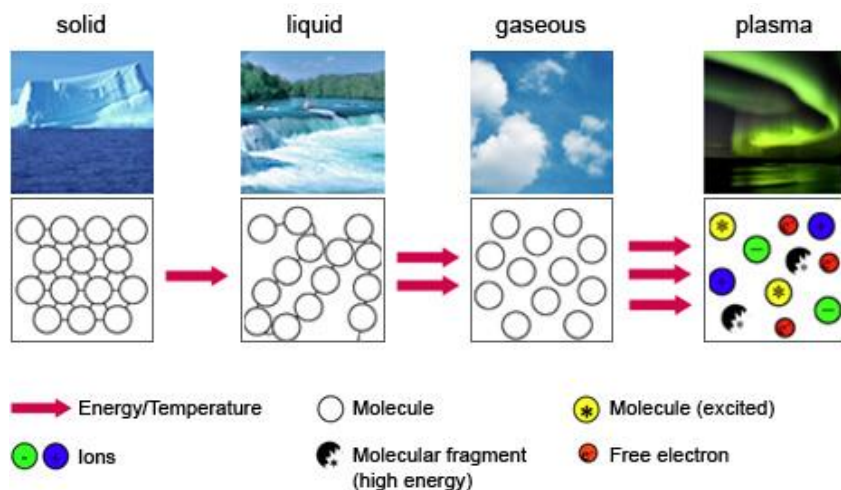


Figura 1. Representación de los cuatro estados de la materia [8]

### 1.2.2.1. Tipos de plasma

El plasma puede ser clasificado en dos categorías según su temperatura, entre ellos está el plasma térmico y el plasma frío (también llamados de alta y baja temperatura).

El plasma térmico es más abundante en la naturaleza, como pueden ser los arcos atmosféricos, las chispas y las llamas [9]. En los plasmas térmicos, la temperatura de los electrones e iones es la misma, alcanzando los  $10^7$  °C [10], por lo que este tipo de plasma no es adecuado para reacciones orgánicas [14]. En las industrias se producen plasmas de entre 5000 y 15000 °C para fundir materiales [11].

El plasma frío se encuentra en un estado de no-equilibrio, debido a que la temperatura del gas que corresponde a la de las partículas ionizadas y neutras, que es cercana a la temperatura ambiente, es mucho más baja que la de los electrones. Tradicionalmente los plasmas fríos se han generado a baja presión [12]. Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado dispositivos con los cuales es posible generar plasma a presión atmosférica conocidos como plasmas fríos a presión atmosférica (CAP de Cold Atmospheric Plasma). Numerosos estudios han demostrado que es de gran interés en biología, microbiología, odontología y oncología, entre otros [13]; con aplicaciones tales como de desinfección, esterilización y regeneración de heridas [14].

Con su alto significado clínico, nace la medicina de plasma, un concepto que se está expandiendo de manera importante en el campo de la investigación. Este trabajo se enfoca en el uso terapéutico del plasma para tratar el cáncer.



### 1.2.2.2. El plasma en terapia de cáncer

El desarrollo de la tecnología del CAP ha permitido el estudio de la interacción directa entre el plasma y tejidos vivos, y a nivel de laboratorio, con células en medio de cultivo.

En la interacción con un organismo vivo o con células, siempre hay implicados medios líquidos – (sangre en el cuerpo, medios de cultivos en el laboratorio...), –se generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) por reacción del plasma con la superficie del líquido, que se ha visto que son las principales responsables de los efectos biológicos del plasma en las células. Asimismo, el campo electromagnético del plasma, la radiación UV y radiación visible de los plasmas atmosféricos también tienen mucha importancia en la fisiología celular de forma global provocando respuestas biológicas (estrés oxidativo) que conducen a la proliferación o muerte celular [15] [21].

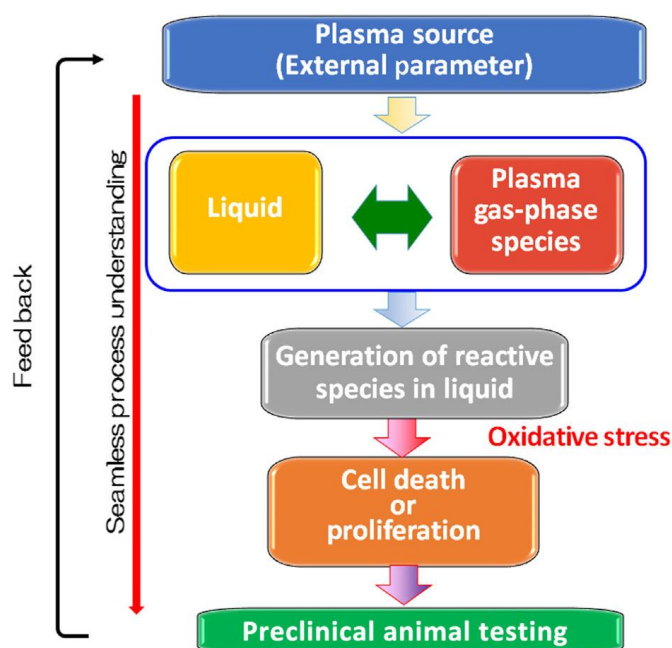


Figura 2. Proceso de la respuesta biológica ante el plasma atmosférico [15]

Los efectos del plasma en células cancerígenas se ha evaluado en distintos tipos de cáncer (cerebral, cervical, colorrectal, de piel, de mama y de pulmón, entre otros) [34] [23], en ensayos *in vitro* y *in vivo*, inhibiendo el crecimiento de las células y/o induciendo la muerte celular, ya sea por necrosis o apoptosis [16] - [18]. Únicamente un trabajo del equipo BBT en que ha realizado un trabajo de master ha estudiado y observado la selectividad de plasma atmosférico en células de osteosarcoma sin afectar a células sanas de hueso.

De ahí el interés de este trabajo para estudiar y ampliar el conocimiento de los efectos del plasma en este tipo de cáncer.

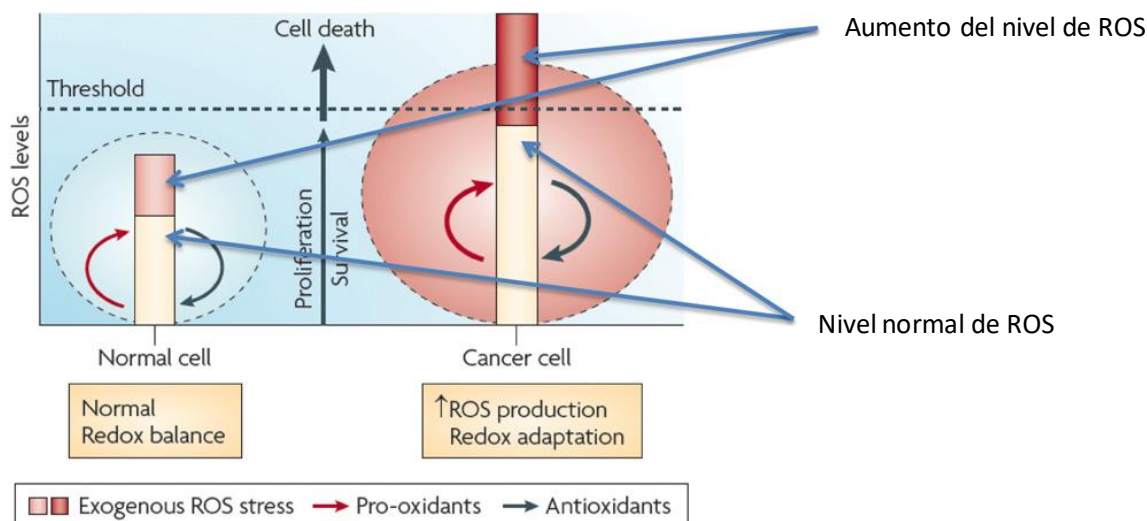


Figura 3. Efecto de las especies reactivas en células sanas y cancerígenas [19]

En la Figura 3 se observa que en una célula sana el nivel metabólico es bajo, por lo cual el sistema antioxidante del organismo puede realizar una auto-regulación del nivel de las RONS producidas, de forma que el nivel no llega al umbral citotóxico que provoca la muerte celular por estrés oxidativo.

En cambio en el caso de una célula cancerígena, el nivel metabólico es alto, provocando un incremento de la producción de RONS que induce la proliferación celular. Este nivel intrínseco de estrés oxidativo se mantiene en todas las células cancerígenas y está cerca del umbral citotóxico, haciéndolas más sensibles y vulnerables al estrés oxidativo generado por RONS externos [19] [20].

En base a esto se explica la selectividad del plasma atmosférico, pues, puede producir la muerte selectiva de las células cancerígenas conservando las sanas. Mediante el plasma se aportan RONS hasta que se alcance el umbral citotóxico, pudiendo detener el ciclo celular con dosis de plasma bajas, inducir a la apoptosis con dosis altas y en última instancia, causar necrosis con las dosis más altas [23].

### 1.2.2.3. Tipos de tratamiento del plasma

En la aplicación del plasma a presión atmosférica se han sugerido dos enfoques diferentes que pueden clasificarse en tratamiento directo e indirecto.

En el tratamiento directo el plasma puede considerarse como una terapia local, siendo el tejido vivo (las células) un electrodo y el plasma el otro electrodo, en el cual las RONS generadas por el plasma reaccionan y difunden primero en el líquido que contiene las células antes de entrar en contacto directo con ellas y afectarlas fisiológicamente. El flujo de cargas llega directamente a la superficie del tejido vivo [14].

En el tratamiento indirecto, se aplica el plasma en un líquido para la producción de RONS y posteriormente el líquido es transferido a las células. Se generan las mismas especies reactivas en las mismas condiciones de tratamiento, con una ventaja en comparación con el directo: evita los efectos de la radiación electromagnética, de la UV y de la radiación visible sobre las células, permitiendo tener únicamente las especies reactivas que se generan en el medio líquido. En esta interacción se forman ROS, RNS y otros componentes del medio líquido (agua, solución acuosa o medio de cultivo) [23].

En este trabajo se pretende estudiar y comparar ambos efectos del plasma en líneas celulares de osteosarcoma.

### **1.2.3. Cultivo celular en 2D y 3D**

A lo largo de los estudios sobre el cáncer se han establecido líneas celulares esenciales para comprender los principios moleculares del cáncer. Desde hace mucho tiempo se han cultivado continuamente células cancerígenas *in vitro* en monocapa (placas para cultivo celular) adaptando a unas condiciones estándares y optimizadas de cultivo. Sin embargo, estas condiciones bidimensionales (2D) no reflejan fielmente la arquitectura y el microambiente de la situación *in vivo* [37].

En los últimos años, la tecnología de los modelos de cultivo celular tridimensional (3D) se ha convertido en un foco de investigación en la biología de las células cancerígenas, permitiendo mimetizar las condiciones del microambiente de las células, que son más similares a las que se encuentra el organismo vivo. Estas células tumorales cultivadas en 3D han demostrado numerosas características (morfología, proliferación y genética, entre otros) diferentes en comparación con el cultivo en 2D [38].

En este trabajo, se pretende estudiar y comparar los efectos del plasma en líneas celulares de osteosarcoma cultivadas en 2D y 3D.

#### **1.2.3.1. Andamio de colágeno/HANP**

Un andamio ideal para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa debe tener características tales como biocompatibilidad, buena porosidad y buena adherencia celular [39].

El colágeno ha sido usado generalmente como biomaterial para la fabricación de andamios, hidrogeles y esponjas por su excelente biocompatibilidad, baja inmunogenicidad y biodegradabilidad; y también por su aptitud a la adherencia celular [31] [40].

Se han realizado investigaciones sobre las aplicaciones óptimas de la hidroxiapatita, un biomaterial compuesto principalmente por calcio y fosfato muy similar a los componentes minerales del hueso, permitiendo mimetizar el hueso humano. Ha sido ampliamente usado en estudios de estructuras tridimensionales, y, asociada con el colágeno, forma un biomaterial biocompatible y bioactivo con respecto a las células y tejidos óseos, además de ser un candidato para la terapia regenerativa ósea [30] [40].

En este trabajo se sintetizan nanopartículas de hidroxiapatita (HANP) incorporadas al colágeno para la generación de andamios, permitiendo el cultivo celular en 3D y posteriormente el tratamiento de plasma atmosférico.

### 1.3. Contexto del trabajo

El cáncer es una de las causas principales de muerte alrededor del mundo, y el osteosarcoma es uno de los cánceres de hueso más frecuentes en niños y jóvenes. Los tratamientos actuales para tratar el osteosarcoma son difíciles de implementar y, lamentablemente, no son completamente efectivas.

Como se ha podido constatar en el apartado anterior, las terapias con plasma a presión atmosférica presentan un creciente interés y se está investigando como posible tratamiento alternativo por mostrar efectividad en estudios in vitro e in vivo en diferentes tipos de cáncer. Se ha observado que la interacción entre plasma y medio líquido genera especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con acción selectiva hacia las células cancerígenas. En este contexto, se quiere estudiar el efecto (directo e indirecto) del plasma, en células en medio de cultivo y en células sembradas en andamios, y comparar la efectividad en ambas situaciones.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación APACHE “Atmospheric Pressure plAsma meets biomaterials for bone Cancer HEaling”, el cual se centra en el diseño de una nueva terapia para el cáncer de hueso mediante las especies reactivas generadas por el plasma a presión atmosférica en combinación con biomateriales.

### 1.4. Objetivos

El objetivo principal de este proyecto es analizar y evaluar los efectos directos e indirectos del plasma atmosférico para el tratamiento del osteosarcoma. El trabajo tiene dos fines:

1. Comparar los tratamientos de plasma atmosférico directos e indirectos sobre células cancerígenas sembradas en placas de 12 pocillos (2D).

2. Comparar los tratamientos de plasma atmosférico directos e indirectos sobre células cancerígenas sembradas en andamios de colágeno con nanopartículas de hidroxiapatita (HANP) (3D).

Los dos objetivos mencionados se desglosan en:

1. Cuantificar las especies reactivas generadas en medios de cultivo y relacionarlo con la viabilidad celular de líneas de osteosarcoma sembradas en 2D, en tratamientos directos e indirectos.
2. Sintetizar HANP y generar andamios de colágeno incorporando las HANP. Cuantificar el ADN de líneas osteosarcoma sembradas en 3D, en tratamientos directos e indirectos.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Dispositivo de plasma atmosférico

En el presente proyecto se emplea el siguiente equipo de haz de plasma atmosférico: “Atmospheric Pressure Plasma Jet”, abreviado como APPJ.

El APPJ es un dispositivo de fabricación doméstica y consiste en un electrodo de descarga formado por un filamento de cobre de 1 mm de diámetro, el cual está insertado en un tubo capilar de cuarzo de 1,2 mm de diámetro cubierto por un cabezal de politetrafluoretileno (PTFE). El electrodo está conectado a una potencia de alto voltaje (Conrad Electronics, consumo de energía de 6 W) y se utiliza el Helio (He, 5.0 Linde, España) como gas inerte entrante para generar el plasma. El flujo de gas se regula mediante un controlador de flujo másico (Bronkhorst Mass View) [25].

Las condiciones de tratamiento con este dispositivo se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de tratamiento de plasma con APPJ

<b>Volumen de medio de cultivo a tratar</b>	2 mL (en placa multipocillo de 12)
<b>Flujo del gas</b>	1 L/min
<b>Distancia (entre el tubo capilar y la superficie del líquido a tratar)</b>	10 mm
<b>Tiempo de tratamiento</b>	30s, 60s, 90s, 15min

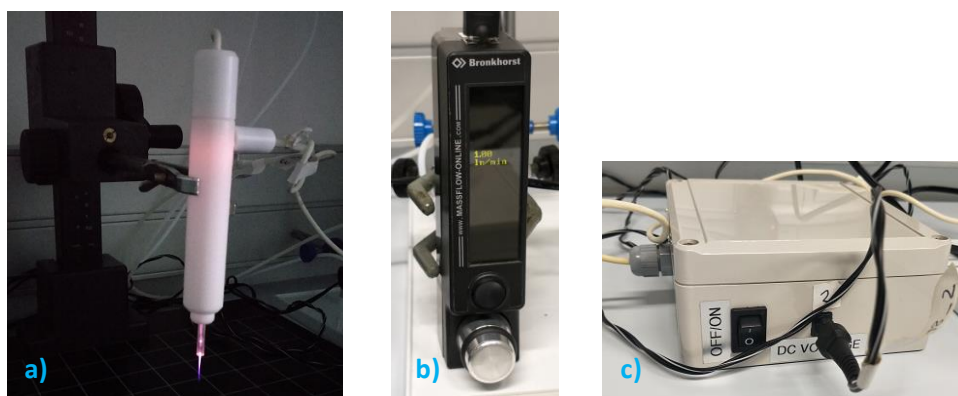


Figura 4. Equipo de plasma atmosférico APPJ. a) Electrodo central rodeado por el tubo capilar dentro del soporte de PTFE, b) Controlador de flujo másico, c) Fuente de alimentación de alto voltaje

## 2.2. Líneas celulares

Las dos líneas celulares de cáncer óseo estudiadas en este trabajo son las SaOS-2 y las U2OS.

## 2.3. Tratamiento con haz de plasma atmosférico en 2D

### 2.3.1. Determinación de especies reactivas

En este apartado se pretende investigar los efectos del tratamiento de plasma a presión atmosférico en el medio de cultivo celular DMEM con piruvato determinando de manera semicuantitativa y cuantitativa tres especies reactivas:  $[H_2O_2]$ ,  $[NO_2^-]$  y especies reactivas de tiempo de corta vida.

Para poder hacer la cuantificación hay que realizar el tratamiento de plasma atmosférico en el medio líquido. Para ello, se necesitan los siguientes materiales y equipos:

- ✓ APPJ
- ✓ Placas multipocillo de 12 (ref: 150628, Thermo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ DMEM con piruvato de sodio (ref: 11995065, Gibco™)

Se extrae el medio DMEM del frigorífico y se deja calentar por breve tiempo en el baño de agua de 37°C. Mientras tanto se prepara el dispositivo APPJ colocándolo dentro de la campana, puesto que posteriormente el tratamiento de las células se realizará en ambiente estéril, por lo cual la cuantificación de especies reactivas también.

Después de haber calentado el medio, con una pipeta se añaden 2 mL en todos los pocillos de una placa multipocillo de 12. Se configura el caudal de Helio a 1 L/min y se ajusta una distancia de 10 mm entre la superficie del líquido a tratar y el inicio del haz de plasma.

Se tratan las muestras con plasma atmosférica, en cuatro tiempos de tratamiento tal y como se representa en la Figura 6. En otra placa aparte, se añaden 2 mL en 3 pocillos sin hacer el tratamiento que corresponden al control. Hay un total de 15 muestras.

Por una parte, la determinación de especies reactivas se puede hacer de forma semi-cuantitativa empleando tiras reactivas que permiten medir la concentración de forma aproximada en mg/L mediante comparación e identificación visual de colores.



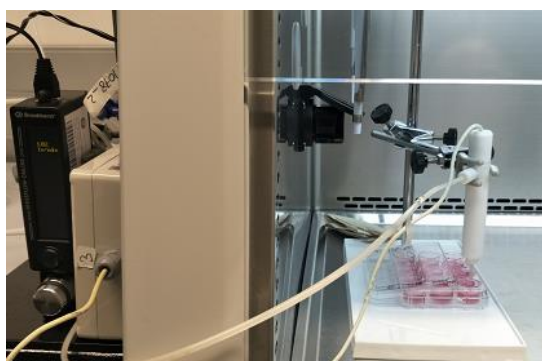


Figura 5. Tratamiento de plasma atmosférico en DMEM

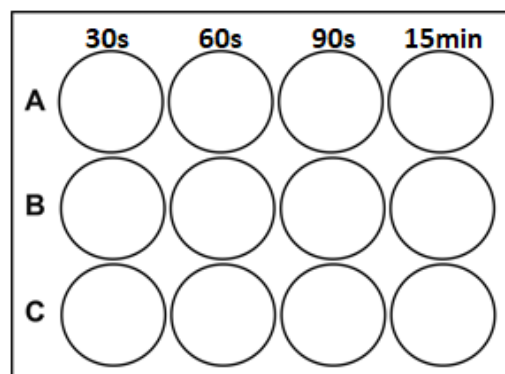


Figura 6. Tiempos de tratamiento

Por otra parte, la cuantificación de especies reactivas se realiza siguiendo unos protocolos establecidos que constan en los Anexos, el método Amplex Red para cuantificar  $H_2O_2$  y el método Griess para cuantificar  $NO_2^-$  en los cuales se emplean la colorimetría y la fluorimetría, respectivamente, que consisten en la espectroscopia de absorbancia y la espectroscopia de fluorescencia, utilizando el lector multi-modal de micro-placas (Figura 7) para analizar las muestras a las longitudes de onda correspondientes.



Figura 7. Lector multi-modal de micro-placas (Synergy HTX, BioTek)

### 2.3.1.1. Determinación semi-cuantitativa de $H_2O_2$ y $NO_2^-$

El material utilizado para determinar las especies reactivas manera semi-cuantitativa es el siguiente (Figura 8):

- ✓ Bandas reactivas de peróxido (Quantofix Peroxides test strips, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- ✓ Bandas reactivas de nitrito (Quantofix Nitrites and Nitrates test strips, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

Inmediatamente después del tratamiento con plasma atmosférico, se deposita una gota del medio tratado sobre las tiras durante unos segundos (según las especificaciones). Se emplea una tira de  $H_2O_2$  y una de  $NO_2^-$  para cada tiempo de tratamiento.



Figura 8. Tiras reactivas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}_2^-$

### 2.3.1.2. Método “Amplex Red ” para cuantificación de $\text{H}_2\text{O}_2$

Para cuantificar los  $\text{H}_2\text{O}_2$  generados, se utiliza el siguiente material:

- ✓ Placa con las 12 muestras tratadas con plasma atmosférico a 4 tiempos diferentes
- ✓ Placa con las 3 muestras sin tratar
- ✓ Placa negra multipocillo de 96 (ref: 437111, Thermo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ Kit de ensayo de peróxido de oxígeno Amplex® Red (Invitrogen, Estados Unidos)
- ✓ Lector multi-modal de micro-placas (Synergy HTX, BioTek, Estados Unidos)

Se preparan los componentes necesarios previos al ensayo, siguiendo el protocolo comercial del kit de Amplex Red de Invitrogen (Anexo 1) [27].

Una vez preparados los componentes, se construye la curva de calibración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  siguiendo el protocolo del Anexo 3 y se diluyen las muestras tratadas en 1X Buffer a un 1/10 de dilución (20  $\mu\text{L}$  de cada muestra en 180  $\mu\text{L}$  de 1X Buffer). Esta dilución se realiza para que las muestras estén en el mismo líquido que la curva de calibración.

Se transfieren 50  $\mu\text{L}$  de todas las muestras (curva de calibración, medio tratado y no tratado) a la placa negra, siendo por triplicado en las muestras tratadas y no tratadas. Posteriormente se añade a todas las muestras 50  $\mu\text{L}$  del reactivo Amplex Red/HRP. Una vez añadido el reactivo se cierra bien la placa con la tapa para proteger las muestras de la luz y se deja 30 min a temperatura ambiente para que reaccione con las muestras.

Finalmente se lee la fluorescencia de las muestras con el lector multi-modal de micro-placas, ajustando la siguiente configuración de lectura:

- $\lambda_{\text{exc.}} = 560/20 \text{ nm}$
- $\lambda_{\text{em.}} = 590/20 \text{ nm}$
- Ganancia = 50

### 2.3.1.3. Método Griess para cuantificación de $\text{NO}_2^-$

Para cuantificar los  $\text{NO}_2^-$  generados, se utiliza el siguiente material:

- ✓ Placa con las 12 muestras tratadas con plasma atmosférico a 4 tiempos diferentes
- ✓ Placa con las 3 muestras sin tratar
- ✓ Placa multipocillo de 96 (ref: 167008, Thermo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ Kit ensayo de nitrito (ref: STA-802, bioNoca S.L.)
- ✓ Lector multi-modal de micro-placas (Synergy HTX, BioTek, Estados Unidos)

Se prepara el reactivo Griess (Anexo 2) y para poder cuantificar los nitritos es necesario realizar una curva de calibración empleando concentraciones conocidas de  $\text{N}_2\text{O}_2^-$  en medio de cultivo DMEM con piruvato (Anexo 4).

Se transfieren 50  $\mu\text{L}$  de todas las muestras (curva de calibración, medio tratado y no tratado) a la placa multipocillo de 96, siendo también por triplicado en las muestras tratadas y no tratadas. Posteriormente se añade a todas las muestras 50  $\mu\text{L}$  del reactivo Griess. En el caso de que el reactivo detecte la presencia de  $\text{NO}_2^-$ , la mezcla se vuelve de color rosado, tal y como se puede apreciar en la Figura 9, y si hay más concentración el color será más intenso. En caso contrario, la mezcla permanecerá transparente. La intensidad del color es proporcional a la concentración de  $\text{NO}_2^-$  [28].

Después de añadir el reactivo, se cubre la placa con papel de aluminio para proteger las muestras de la luz, y se incuba por un periodo de 10 min a temperatura ambiente.

Finalmente se lee la absorbancia de las muestras con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

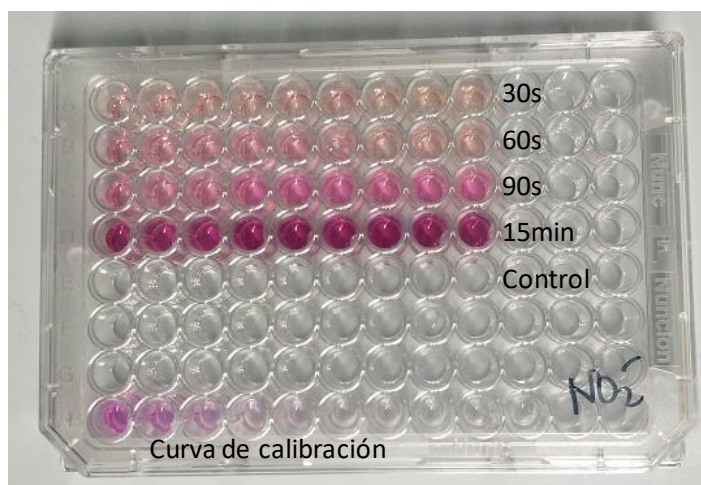


Figura 9. Muestras con el reactivo Gr añadido para cuantificar la concentración de  $\text{NO}_2^-$

### 2.3.1.4. Cuantificación de especies reactivas de tiempo de vida corta

En el caso de las especies reactivas de tiempo de corta vida, no se pueden detectar directamente ya que es una mezcla de varias especies y no es posible realizar la curva de calibración [26]. Su método de cuantificación se explica a continuación.

Para cuantificar las especies reactivas de tiempo de vida corta generadas, se utiliza el siguiente material:

- ✓ Placa con las 12 muestras tratadas con plasma atmosférico a 4 tiempos diferentes
- ✓ Placa con las 3 muestras sin tratar
- ✓ Placa negra multipocillo de 96 (ref: 437111, Thermo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ Diclorofluoresceína (DCF) (Molecular Probes, Inc., Estados Unidos)
- ✓ Lector multi-modal de micro-placas (Synergy HTX, BioTek, Estados Unidos)

Se transfieren por triplicado 150  $\mu$ L de todas las muestras (medio tratado y no tratado) a la placa negra y se les añade 1  $\mu$ L de DCF. Se deja la placa por un periodo de incubación de 30 min a 37  $^{\circ}$ C.

Finalmente se lee la fluorescencia de las muestras con el lector multi-modal de micro-placas, ajustando la siguiente configuración de lectura:

- $\lambda_{exc.} = 485/20$  nm
- $\lambda_{em.} = 528/20$  nm
- Ganancia = 100

### 2.3.2. Efectos del plasma atmosférico en cultivos celulares en 2D

#### 2.3.2.1. Siembra de células

A continuación todo el procedimiento experimental se realiza dentro de la campana (se trabaja en un ambiente estéril). Se utiliza el siguiente material:

- ✓ PBS
- ✓ Tripsina (TrypLE, Invitrogen)
- ✓ DMEM con piruvato de sodio (ref: 11995065, Gibco™)
- ✓ Placas multipocillo de 12 (ref: 150628, Thermo Fisher, Estados Unidos)

Para estudiar el efecto directo e indirecto del tratamiento de plasma atmosférico sobre una línea celular, se utilizan dos placas multipocillo de 12, con la distribución representada en la Figura 10.

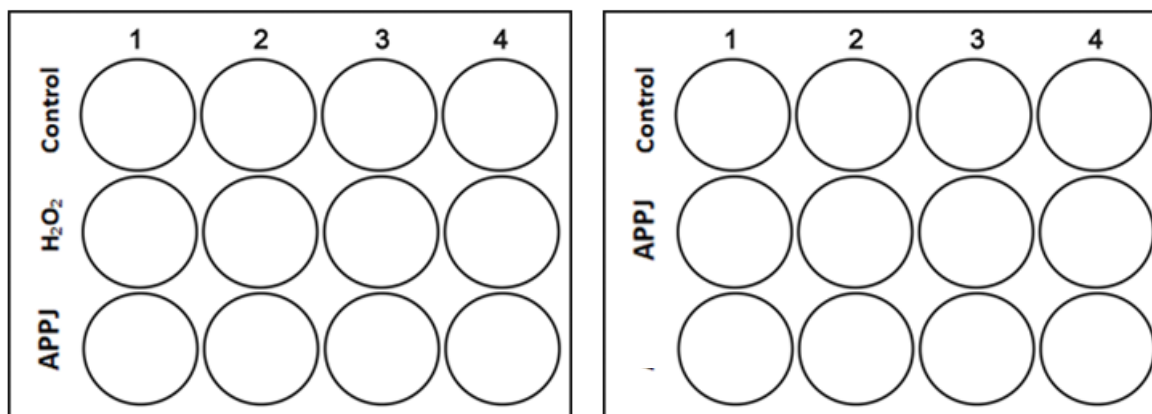


Figura 10. Representación de las dos placas por línea celular. La placa de la izquierda corresponde al tratamiento directo y la de la derecha el indirecto. Son 12 y 8 muestras respectivamente.

Se saca el flask que contiene las células del incubador a 37 °C y se realiza la siembra de células dentro de la campana. Primero se aspira el medio y se lava el interior del flask con PBS. Se aspira el PBS y se añade tripsina para la tripsinización y se resuspenden las células añadiendo medio. Se cuentan las células mediante la cámara de Neubauer (Figura 11).



Figura 11. Cámara de Neubauer

Después de contar la cantidad de células utilizando la cámara de Neubauer se hacen las diluciones necesarias para poder sembrar 2 mL de medio con 50.000 células en cada pocillo. Una vez sembradas las células en las placas, se incuban 24h a 37 °C para que proliferen.

### 2.3.2.2. Tratamiento directo e indirecto de plasma y tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Al día siguiente, se tratan las células. Para ello, se necesitan los siguientes materiales y equipos:

- ✓ APPJ
- ✓ Placas multipocillo de 12 (ref: 150628, Thermo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ DMEM con piruvato de sodio (ref: 11995065, Gibco™)
- ✓ Solución de peróxido de hidrógeno 30 % (ref: H1009-500ML, 9,8M, Sigma-Aldrich)

Se realiza en todas las placas el tratamiento de plasma atmosférico con el APPJ en las condiciones descritas en el apartado 2.1. En el tratamiento directo el plasma es aplicado directamente sobre el medio DMEM que contiene las células. En cambio, en el tratamiento indirecto, se prepara una placa aparte con pocillos de 2 mL de medio DMEM (calentado previamente a 37 °C) cada uno y se aplica el plasma en este medio. Se aspira el medio del pocillo de la placa con células sembradas y se transfiere el medio recién tratado al pocillo que contiene las células. Este traspaso de medio se hace uno por uno (después de tratar un pocillo se hace al cambio, y así sucesivamente).



Figura 12. Células en medio DMEM tratadas con plasma directa e indirectamente

Después de haber realizado los dos tratamientos de plasma (Figura 12), se realizan las diluciones necesarias para obtener 2 mL de peróxido de hidrógeno a una concentración de 100  $\mu$ M en cada pocillo, ya que esta es la concentración en la cual el peróxido de oxígeno tiene un efecto significativo en las células cancerígenas [29], y posteriormente se podrá comparar su efecto con el del plasma atmosférico.

Los medios del control se dejan sin tratar.

Se incuban las células a 37 °C durante 24, 48 y 72h.

### 2.3.2.3. Ensayo WST-1 de viabilidad celular

Se incuban las placas por un tiempo de incubación (24, 48 y/o 72 h), y al finalizar este tiempo se procede a realizar el ensayo WST-1 de viabilidad celular. El material necesario es:

- ✓ Reactivo WST-1 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- ✓ DMEM con piruvato de sodio (ref: 11995065, Gibco™)
- ✓ Placa multipocillo de 96 (ref: 167008, Termo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ Lector multi-modal de micro-placas (Synergy HTX, BioTek, Estados Unidos)

Se descongela el vial que contiene reactivo WST-1 y en función del número de muestras que haya, se prepara la cantidad necesaria para trabajar a una concentración de 18  $\mu\text{L}$  de WST-1 por 1 mL de medio. Esta solución total de la mezcla se prepara en un tubo Falcon y se agita. Se aspira el medio de las placas con las células tratadas y se añade 1 mL de la solución de medio con WST-1 a cada pocillo. Se incuban las placas 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Después de incubarlas, de cada muestra se transfieren por triplicado 100  $\mu\text{L}$  a la placa multipocillo de 96 (Figura 13).



Figura 13. Placa multipocillo de 96 con las muestras por triplicado

Finalmente se lee la absorbancia de las muestras con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 440 nm.



## 2.4. Tratamiento con haz de plasma atmosférico en 3D

### 2.4.1. Síntesis de HANP

La síntesis de HANP se realiza siguiendo el protocolo que consta en la bibliografía [32]. Se calcula y se prepara la cantidad necesaria de los componentes (hidróxido de calcio y ácido fosfórico) para la síntesis (Anexo 5).

En primer lugar se llena el baño de agua destilada hasta la altura de la bomba para su correcto funcionamiento. Se enciende el interruptor del cabezal azul y se ajusta el baño a 40 °C, temperatura a la que se llevará a cabo la reacción química.

El Thermo Jacketed Vessel, que es un vaso de doble vidrio, se le transfiere calor por parte del baño de agua mediante un circuito cerrado en el cual pasa fluido con la temperatura a la que se ajuste. De esta manera, se puede mantener la reacción química dentro del Jacketed Vessel a una temperatura constante deseada. Se limpia el Thermo Jacketed Vessel con agua y jabón. Con el agitador enchufado y encendido, se ajusta la velocidad de agitación a unos 700 rpm, se coloca el Jacketed Vessel encima con un imán de agitación dentro y se vierte el hidróxido de calcio (Figura 14).

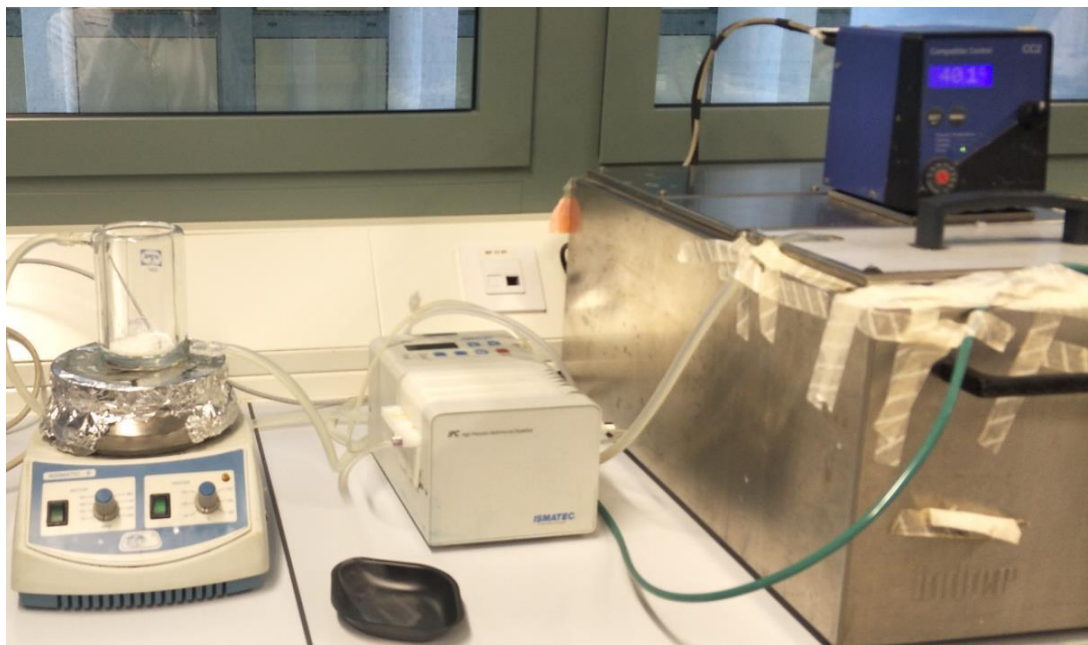


Figura 14. Thermo Jacketed Vessel con el hidróxido de calcio, bajo agitación constante y conectado al baño de agua

Dentro se le añaden 100 mL de agua destilada y se tapa con papel de aluminio para que durante la homogeneización la solución no salpique.



Mientras tanto, se calibra el pHímetro siguiendo su manual de calibración. Después de calibrarlo, se quita el papel de aluminio y se coloca el pHímetro dentro del Thermo Jacketed Vessel (Figura 15).

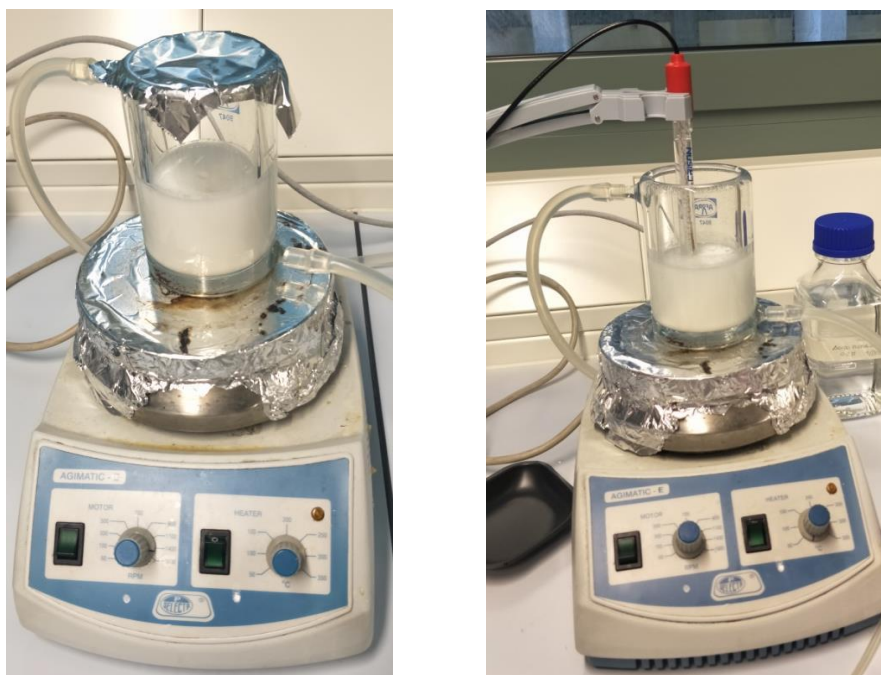


Figura 15. a) Solución de hidróxido de calcio, b) pHímetro colocado en la solución

Se enciende la bomba peristáltica y se pone la parte final del tubo en el frasco de vidrio que contiene la solución de ácido fosfórico. Se ajusta el flujo a 20 mL/min y el líquido recorre por dentro del tubo flexible. Cuando esté a punto de llegar a la punta, se vuelve a ajustar a 1 mL/min, y se para el flujo.

Se coloca la punta del tubo junto con el pHímetro y se adhiere con cinta adhesiva, tal y como muestra la Figura 16.

Se enciende la bomba y se deja que la solución 0,2 M de ácido fosfórico sea añadida al hidróxido de calcio gota a gota a un flujo constante de 1 mL/min bajo una agitación constante.



Figura 16. Reacción química gota a gota bajo control del pH

Durante la reacción, se tiene control del pH. Se espera en torno a 1 h y 20 min hasta que el pH baje a 8, y se para la bomba. Se espera otra vez hasta que el pH se estabilice (unos 30 min), y se vierten los 200 mL de la solución obtenida en un vaso precipitado y taparlo con papel de aluminio. Se deja reposar una noche para permitir separar las nanopartículas de hidroxipatita (Figura 17).

Con una pipeta se extraen  $\frac{3}{4}$  partes del líquido sobrenadante, se remueve la solución y se distribuye de manera equilibrada en 4 tubos Falcon. Se ajusta la centrifuga a 2500 rpm y se centrifuga 1 min.



Figura 17. Líquido sobrenadante en la parte superior

A continuación se realiza el lavado: se retira el líquido sobrenadante de cada tubo y se les añade agua destilada para resuspender las nanopartículas. Se agitan con el vortex (Figura 18) y si necesario se remueven mecánicamente (con una pipeta). Se asegura de que no queden grumos en las soluciones de los 4 tubos. Después de haber homogeneizado bien la solución, se vuelve a resuspender el precipitado utilizando la centrifuga.



Figura 18. Homogeneización y resuspensión de las HANP mediante vortex

Se repiten 4 veces los pasos anteriores, con el fin de hacer 5 lavados en total para que la conductividad de la solución sea como el del agua pura. En la Figura 19 se puede apreciar las nanopartículas en resuspensión (a) o en precipitado después de la centrifugación (b).

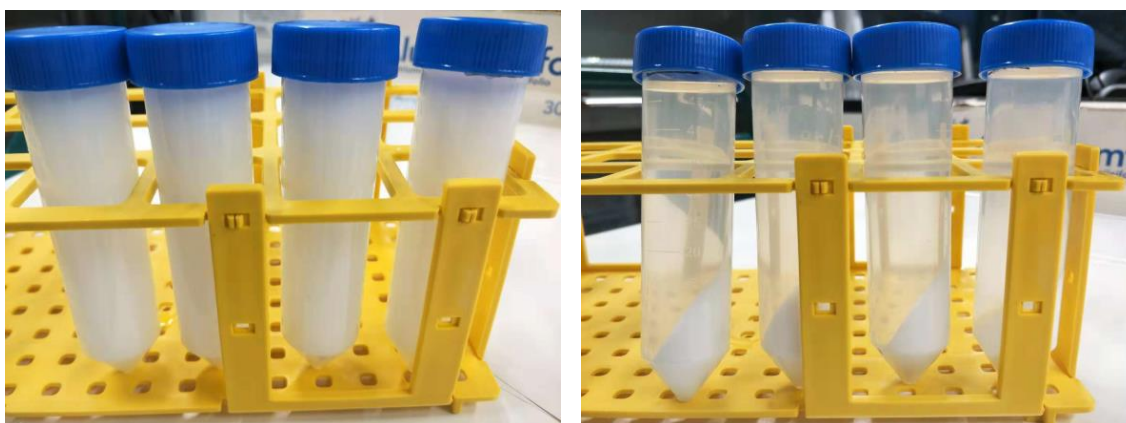


Figura 19. a) Lavado b) Centrifugado

Después de la última ronda de centrifugación, se tira el líquido sobrenadante se le ponen a los tubos Falcon las tapas agujereadas.

Se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 o 4 h, poniéndolos en posición horizontal, de esta forma hay más superficie congelada que posteriormente facilita el proceso de liofilización.

Se dejan una noche o un fin de semana en el liofilizador.



Figura 20. a) Muestras en el liofilizador, b) HANP obtenidas

Después de liofilizar las muestras de HANP, se juntan todas en un solo tubo Falcon, tal y como se observa en la Figura 20 b).

Con la ayuda de un mortero (Figura 21 a), se separan las HANP que tras la liofilización habían quedado compactadas.



Figura 21. a) Separar las HANP, b) Muestra de HANP para hacer la difracción de rayos X

#### 2.4.2. Síntesis de andamios de colágeno con HANP

Los materiales y equipos necesarios para el primer día son los siguientes:

- ✓ Solución de las HANP dispersas
- ✓ Colágeno (tipo I, ref: C3867-1VL, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- ✓ 2 placas multipocillo de 6
- ✓ Sonicator (Branson Digital, Model 250 W)
- ✓ Liofilizador (Telstar Cryodos)

Para preparar andamios de colágeno con hidroxiapatita, se prepara primero una suspensión (al 5%) de las HANP (Anexo 6) y se calcula la composición necesaria de HANP y colágeno en cada andamio (Anexo 7).

Seguidamente, se preparan 2 placas de 6 pocillos y se corta la tapa de los 30 Eppendorfs (para realizar 30 esponjas). Se colocan las tapas en las placas (3 en cada pocillo), y se añaden a cada molde 200  $\mu$ L de la mezcla de colágeno y HANP preparada (Figura 22) mediante el método descrito en el Anexo 7.



Figura 22. Colágeno con las HANP dentro de los moldes

Se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 4 h y posteriormente se liofilizan una noche. Guardar la placa multipocillo de 6 para el día siguiente.

Los materiales y equipos necesarios para el segundo día son los siguientes:

- ✓ 3 placas multipocillo de 24
- ✓ Sonicador (Branson Digital, Model 250 W)
- ✓ Liofilizador (Telstar Cryodos)

Al día siguiente, se recogen las esponjas del liofilizador y se colocan en placas multipocillo de 12, cada esponja en un pocillo. Guardar los moldes para su uso posterior.

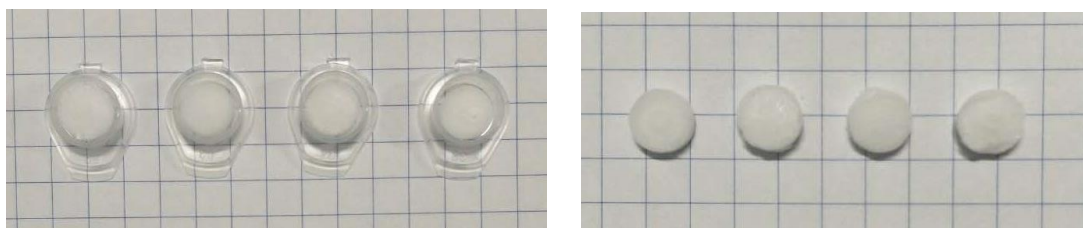


Figura 23. Andamios después de la liofilización



Se prepara la solución para entrecruzar (reticular) los andamios (Anexo 8) y se realiza el entrecruzamiento dentro de la campana. Se transfiere el etanol al tubo que contiene los agentes de reticulación (EDC y NHS, preparados siguiendo el Anexo 8), se remueve, y se añade 2 mL de la solución a cada pocillo. Se dejan 4 h para su reacción.

Después del entrecruzamiento, se llena medio tubo Falcon de agua destilada, y con unas pinzas se recogen las esponjas y se colocan dentro. Se remueve un poco y se tira el agua.

Se llena todo el tubo de agua destilada y se remueven bien, de arriba abajo, sin agitar. Se tira el agua. Repetir 4 veces más, para hacer un total de 5 lavados (Figura 24).



Figura 24. Lavado de los andamios

Al acabar los lavados, primero se ponen los moldes en las placas multipocillo de 6 y después se colocan las esponjas dentro de los moldes, y se le añaden un poco de agua destilada (hasta el límite de la tapa) para que estas no pierdan su forma. Se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1-2 h y se dejan reliofilizar otra noche.



Figura 25. Andamios después del entrecruzamiento reliofilizados

### 2.4.3. Efectos del plasma atmosférico en cultivos celulares en 3D

#### 2.4.3.1. Siembra de células

Se dejan los andamios sumergidos en etanol al 70 % un día previo a la siembra de células.

A continuación todo el procedimiento experimental se realiza dentro de la campana (se trabaja en un ambiente estéril). Para la siembra de células en los andamios, se utiliza el siguiente material:

- ✓ PBS
- ✓ Trypsina (TrypLE, Invitrogen)
- ✓ DMEM con piruvato de sodio (ref: 11995065, Gibco™)
- ✓ 2 Placas multipocillo de 12

Para estudiar el efecto directo e indirecto del tratamiento de plasma atmosférico sobre una línea celular, se utilizan unas placas multipocillo de 12, con la distribución representada en la Figura 26.

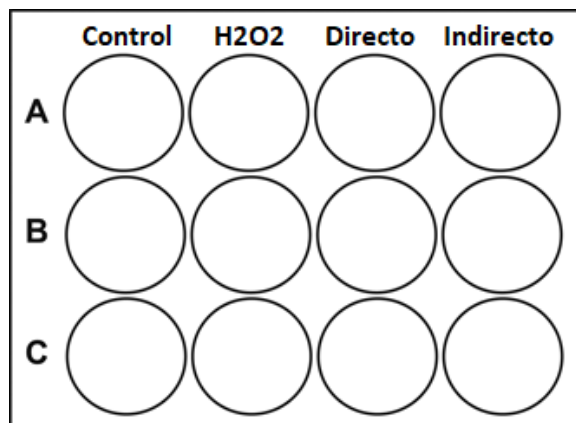


Figura 26. Representación de placa por una línea celular, 3 muestras por cada condición

Se hacen los cálculos necesarios para sembrar  $10^6$  células en cada andamio.

Se saca el flask que contiene las células del incubador a 37 °C y se realiza la siembra de células dentro de la campana. Primero se aspira el medio y se lava el interior del flask con PBS. Se aspira el PBS y se añade tripsina para la tripsinización y se resuspenden las células añadiendo medio. Se traspasa el medio con las células en un tubo Falcon de 50 mL. Al acabar se cogen 10 µL de y se cuentan las células mediante la cámara de Neubauer.

Después de contar la cantidad de células presentes se hacen los cálculos necesarios para 20 de medio con aproximadamente  $10^6$  células en cada andamio (Figura 27). Se añaden 2 mL de DMEM en cada pocillo.



Figura 27. Andamio del primer pocillo sembrado con células

Una vez sembrada la línea celular SaOS-2 en 12 andamios, se realiza el mismo procedimiento para las U2OS en otros 12 andamios, de manera que es una placa de 12 pocillos por una línea celular.

Una vez sembradas las células en los andamios, se incuban 72 h a 37 °C para que proliferen.

#### 2.4.3.2. Tratamiento directo e indirecto de plasma y tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Al cabo de tres días, se tratan con plasma las células sembradas. Para ello, se necesitan los siguientes materiales y equipos:

- ✓ APPJ
- ✓ Placas multipocillo de 12 (ref: 150628, Thermo Fisher, Estados Unidos)
- ✓ DMEM con piruvato de sodio (ref: 11995065, Gibco™)
- ✓ Solución de peróxido de hidrógeno 30 % (ref: H1009-500ML, 9,8M, Sigma-Aldrich)

Se realiza en todas las placas el tratamiento de plasma atmosférico con el APPJ (Figura 28) en las condiciones mencionadas en el apartado 2.1. En el tratamiento directo el plasma es aplicado directamente sobre el andamio que contiene las células. En cambio, en el tratamiento indirecto, se prepara una placa aparte con 8 pocillos de 2 mL de medio DMEM (calentado previamente a 37 °C) y se aplica el plasma en este medio. Se aspira el medio del pocillo de la placa incubada que contiene el andamio con células y se transfiere el medio recién tratado al pocillo que contiene el andamio. Este



traspaso de medio se hace uno por uno (después de tratar un pocillo se hace al cambio, y así sucesivamente; la placa con andamios permanece en la incubadora mientras se hace el tratamiento indirecto en la otra).



Figura 28. Tratamiento de plasma atmosférico en andamios con células

Después de haber realizado los dos tratamientos de plasma, se realizan las diluciones necesarias para obtener 2 mL de peróxido de hidrógeno a una concentración de 100  $\mu$ M en cada pocillo y se tratan las células de la segunda columna.

Los andamios pertenecientes al control se dejan sin tratar.

Se incuban los andamios por un periodo de 72 h.

#### 2.4.3.3. Ensayo Picogreen de análisis de ADN

Después de 3 días de incubación se procede a realizar el ensayo Picogreen, que consiste en cuantificar el ADN de doble cadena presente en una muestra dada, cuya cantidad puede ser usada como un marcador de proliferación celular [41].

Se prepara la solución de digestión siguiendo el protocolo de Picogreen siguiendo el Anexo 9.

Una vez preparada la solución de digestión, se llenan 2 placas multipocillo de 12 con 2 mL de PBS en cada pocillo. Se extraen las dos placas de la incubadora y se lava cada andamio sumergiéndolo en PBS por unos segundos, y se coloca el andamio dentro de un Eppendorf.

Se añade 1 mL de la solución de digestión a cada Eppendorf que contiene un andamio, y se agita mediante vortex. Se colocan los Eppendorfs en la estufa a 65  $^{\circ}$ C y se dejan digerir durante una noche (Figura 29).



Figura 29. Estufa con las muestras a 65 °C

El material necesario para el siguiente día es:

- ✓ Kit de ensayo de Picogreen (ref: P11496, Invitrogen)
- ✓ Placa negra multipocillo de 96 (TermoFisher, Estados Unidos)
- ✓ Lector multi-modal de micro-placas (Synergy HTX, BioTek, Estados Unidos)

Se extraen los Eppendorfs de la estufa y se dejan enfriar hasta que puedan ser manejables. Mientras tanto se construye la curva de calibración de ADN  $\lambda$  estándar siguiendo el Anexo 10.

Se diluyen las 24 muestras a una dilución 1/100 (2  $\mu$ L de cada muestra en 198  $\mu$ L de 1X TE Buffer) y se transfieren 100  $\mu$ L de todas las muestras (curva de calibración y muestras) a la placa negra.

Se diluyen 50  $\mu$ L del reactivo Picogreen en 10 mL de 1X TE Buffer en un tubo Falcon tapado con papel de aluminio para protegerlo de la luz. De la solución Picogreen diluida, se añaden 100  $\mu$ L a las muestras de la placa negra y finalmente se hace la lectura de fluorescencia de las muestras con el lector multi-modal de micro-placas, ajustando la siguiente configuración de lectura:

- $\lambda_{exc.} = 485/20$  nm
- $\lambda_{em.} = 528/20$  nm
- Ganancia = 50

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Estudio del 2D

En este apartado evalúa la generación de especies reactivas en medio de cultivo (DMEM con piruvato) mediante tratamiento con plasma atmosférico y su efecto sobre la viabilidad celular. Las condiciones tratamiento con plasma se han fijado a 10 mm de distancia y con un flujo de Helio de 1L/min.


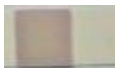


##### 3.1.1. Tiras reactivas: aproximación a la concentración de especies reactivas

En este apartado se muestran los resultados de la evaluación semi-cuantitativa de peróxidos y nitritos con tiras reactivas, como primera aproximación. Se han realizado tratamientos de plasma en el medio de cultivo a distintos tiempos.

##### 3.1.1.1. Determinación semi-cuantitativa de $H_2O_2$

En la Tabla 2 se puede apreciar que la concentración de peróxidos en el medio de cultivo es mayor a medida que aumenta el tiempo de tratamiento. Si se comparan los colores obtenidos con los estándares (Figura 30) podemos identificar la concentración aproximada de  $H_2O_2$  presente. El tiempo de tratamiento que tiene más concentración de  $H_2O_2$  es el de 15 min.

Tabla 2. Tiras reactivas de  $H_2O_2$  obtenidas después de tratar medio DMEM durante 30s, 60s, 90s y 15min

Tiempo de tratamiento	Concentración [mg/L]	Tira reactiva
30 s	0	
60 s	< 0,5	
90 s	[0,5 - 2]	
15 min	[10 - 25]	

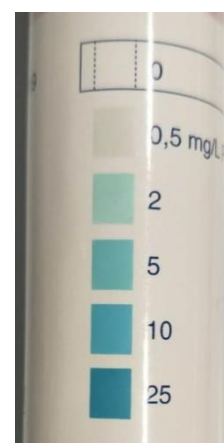






Figura 30. Leyenda de la concentración de  $H_2O_2$  según la intensidad del color

Nota: el tono rosado que se ve en la tira reactiva de 30 s es el color del medio DMEM.

### 3.1.1.2. Determinación semi-cuantitativa de $\text{NO}_2^-$

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con las tiras reactivas de  $\text{NO}_2^-$ . Al igual que los resultados obtenidos para el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la concentración de nitritos aumenta progresivamente con el tiempo de tratamiento con plasma, pero las concentraciones obtenidas son más bajas si se comparan los colores obtenidos con los estándares (Figura 31). La máxima concentración de  $\text{NO}_2^-$  se da a los 15 min de tratamiento.

**Tabla 3.** Tiras reactivas de  $\text{NO}_2^-$  obtenidas después de tratar medio DMEM durante 30s, 60s, 90s y 15min

Tiempo de tratamiento	Concentración [mg/L]	Tira reactiva
30 s	0	
60 s	< 1	
90 s	[1 - 5]	
15 min	10	



**Figura 31.** Leyenda de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  (derecha) según la intensidad del color

### 3.1.2. Generación de especies reactivas en DMEM por tratamiento con plasma

#### 3.1.2.1. Curvas de calibración

Para poder determinar la concentración de especies reactivas que se generan en el medio DMEM con exactitud en diferentes tiempos de tratamiento con plasma, es necesario realizar curvas de calibración que relacionen la concentración con la absorbancia medida por el espectrofotómetro, según la ley de Beer-Lambert. La figura 32 corresponde a las curvas de calibración construidas con las diluciones seriadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}_2^-$  (de acuerdo con los métodos descritos en los Anexos 3 y 4).

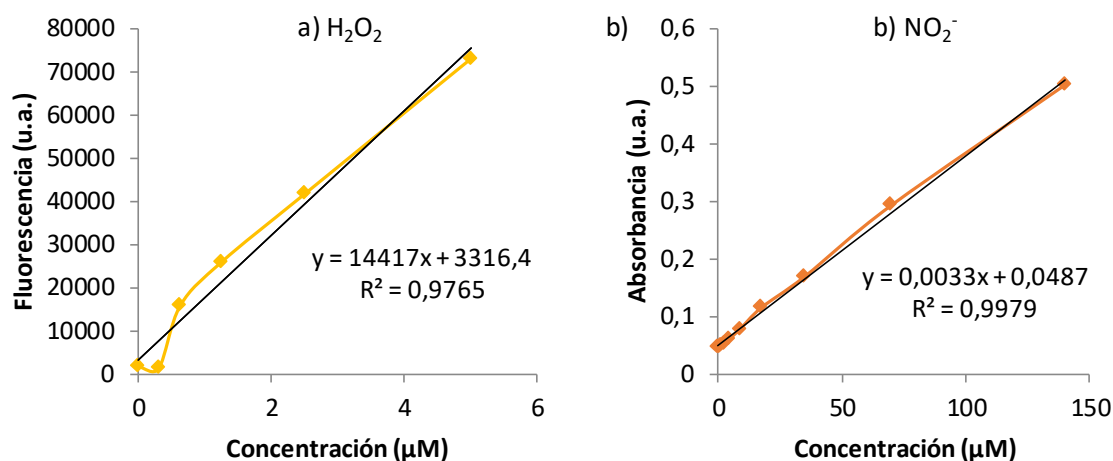


Figura 32. Curvas de calibració per a medi DMEM. a)  $\text{H}_2\text{O}_2$  Y b)  $\text{NO}_2^-$

### 3.1.2.2. Cuantificación de RONS: determinación del tiempo de tratamiento óptimo

Con el fin de determinar el tiempo de tratamiento óptimo, que corresponde a la máxima generación de especies reactivas, el ensayo realizado fue a cuatro tiempos de tratamiento con plasma, con tres replicados en cada caso.

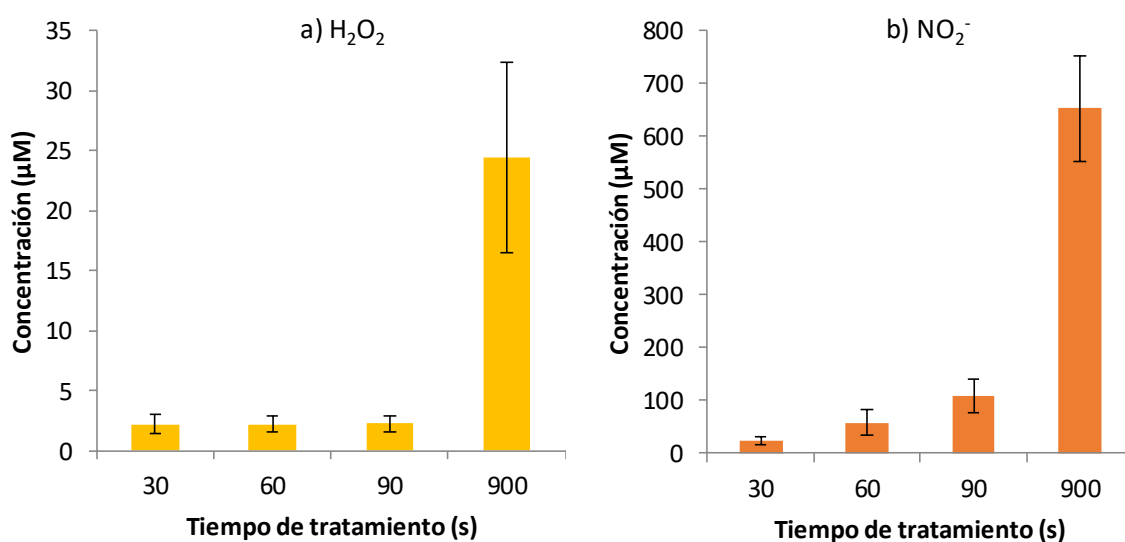
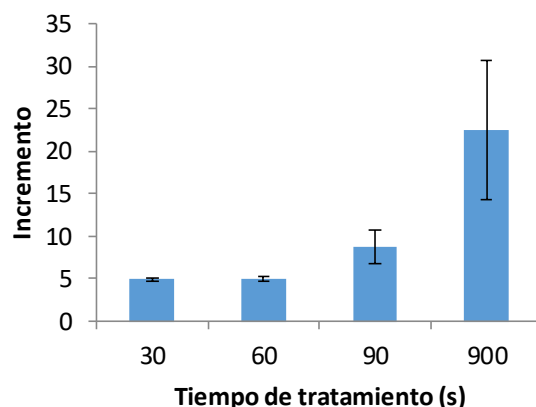


Figura 33. Concentració de espècies reactivas en DMEM amb piruvato a diferents temps de tractament amb plasma atmosfèric [10 mm, 1L/min]

En la Figura 34 se presenta la cantidad de especies reactivas de tiempo de vida corta en el medio de cultivo a distintos tiempos de tratamiento con plasma. En este caso se presentan los valores relativizando los valores de absorbancia del medio tratado con los del control, puesto que las

especies de tiempo de vida corto son una mezcla de especies y no se puede realizar curva de calibración.



**Figura 34. Incremento de las especies de tiempo de vida corta en medio generadas por el plasma atmosférico relativo al medio no tratado**

En la Figura 33 se puede observar que en las especies reactivas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}_2^-$ , cuyas concentraciones están representadas en función del tiempo de tratamiento, se obtienen valores mayores de concentración a mayor tiempo, como se había visto de forma más aproximada con el ensayo semi-cuantitativo.

En el caso de las especies de corta vida (Figura 34), se ve que los resultados concuerdan con los que se obtuvieron en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}_2^-$ . Se genera una mayor concentración a más tiempo de tratamiento, alrededor de 22 veces más que en el control durante 15 min de tratamiento.

Por tanto, para ensayos celulares se seleccionará como el tiempo de tratamiento óptimo 15 min, que permite obtener  $[652 \pm 99] \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $[24 \pm 8] \mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ .

### **3.1.3. Efecto del tratamiento de plasma sobre la viabilidad celular de osteosarcoma en 2D**

En este apartado se analiza el efecto del tratamiento de plasma sobre la viabilidad celular de dos tipos de células de osteosarcoma: SaOS-2 y U2OS, medida mediante WST-1. Las células sembradas se han sembrado en placas de cultivo de 12 pocillos (cultivo en 2D).

Se ha querido realizar primero un ensayo con un tiempo de tratamiento de plasma más corto (90s) para verificar su efecto sobre la viabilidad celular.

En las siguientes figuras se compara el efecto de 90s de tratamiento directo durante de las células con plasma, con el tratamiento indirecto, en que se trata medio de cultivo (DMEM con piruvato) que se añade posteriormente sobre los andamios.

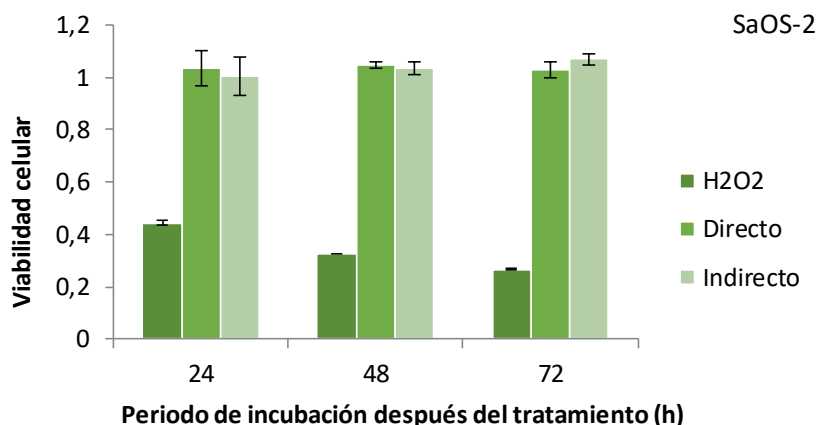


Figura 35. Viabilidad celular de SaOS-2 tratadas 90s de forma directa o indirecta con plasma, a tres tiempos de incubación tras el tratamiento.  $H_2O_2$  como control positivo (100  $\mu M$ ).

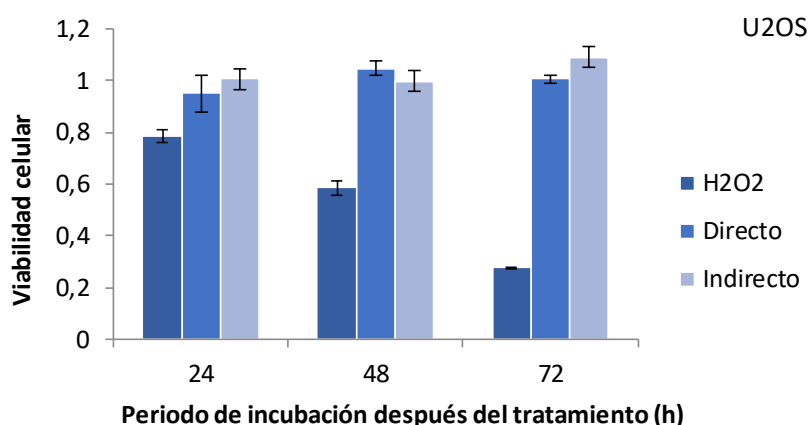


Figura 36. Viabilidad celular de U2OS tratadas 90s de forma directa o indirecta con plasma, a tres tiempos de incubación tras el tratamiento.  $H_2O_2$  como control positivo (100  $\mu M$ ).

En las Figuras 35 y 36 se muestran los resultados obtenidos de la viabilidad celular, relativos a las muestras sin tratar (control), empleando un tiempo de tratamiento de 90s. Se observa que con 90s de tratamiento en ambas líneas celulares no hay mucha diferencia entre el efecto del tratamiento directo y del indirecto, puesto que la viabilidad celular de ambas ronda al 1; y tampoco tiene un impacto en la fisiología celular (ni proliferan ni mueren). En cambio con el tratamiento de 100  $\mu M$  de peróxido sí que se observa una disminución de células: hay más muerte celular a mayor periodo de incubación después del tratamiento, siendo alrededor del 70 % de muerte celular después de 72 h en las dos líneas celulares.

Visto que con 90s de tratamiento de plasma no tiene un efecto significativo en la viabilidad de las células cancerígenas, lo que puede atribuirse a la bajísima concentración de especies reactivas que se generan en el medio a este tiempo de tratamiento (Figura 33 y 34), se hizo un ensayo con 15 min de tratamiento y 72 h de incubación. Se comparan los resultados obtenidos con los de 90s de tratamiento y se obtienen las gráficas de las Figuras 37 y 38, correspondientes a las SaOS-2 y U2OS respectivamente.

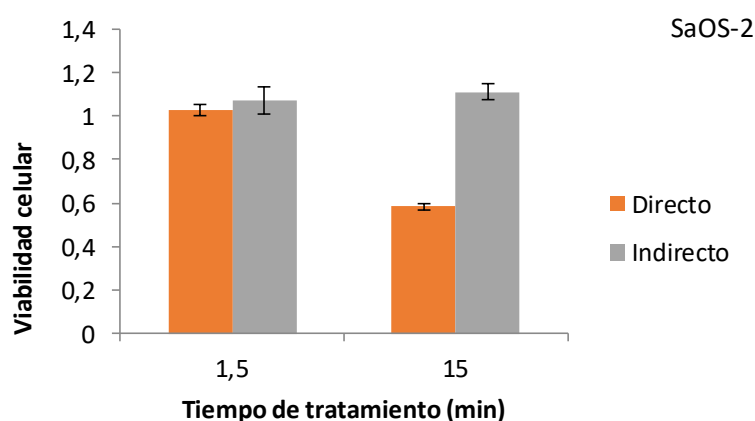


Figura 37. Comparativa de la viabilidad celular de SaOS-2 tratadas 90s y 15min de forma directa e indirecta con plasma, a 72h de Incubación.

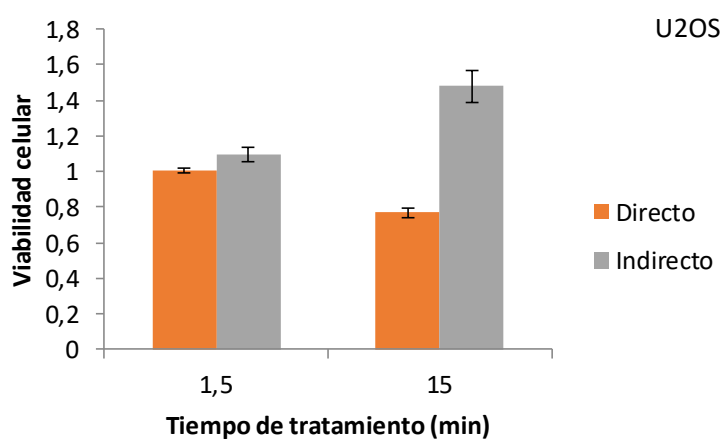


Figura 38. Comparativa de la viabilidad celular de U2OS tratadas 90s y 15min de forma directa e indirecta con plasma, a 72h de Incubación.

En ambas líneas celulares se puede apreciar que con el tratamiento indirecto las células proliferan (mayor proliferación en las U2OS que en las SaOS-2). En cuanto al tratamiento directo, sí que induce muerte celular, alrededor de un 40 % en las SaOS-2 y un 30 % en las U2OS.



## 3.2. Estudio del 3D

En este apartado se caracteriza en primer lugar las HANP sintetizadas mediante difracción de rayos X y, posteriormente, se estudian propiedades como la degradación y la capacidad de absorción de los andamios de colágeno con HANP incorporadas. Por último, se evalúan los efectos directos e indirectos del tratamiento de plasma atmosférico en células tumorales sembradas en los andamios.

Las condiciones tratamiento con plasma son las mismas que en 2D, a 10 mm de distancia y con un flujo de Helio de 1L/min.

### 3.2.1. Caracterización de las HANP mediante difracción de rayos X

En primer lugar se analizan los resultados obtenidos de la difracción de rayos X para determinar si el material que se ha sintetizado es hidroxiapatita. La gráfica que se muestra en la Figura 39 (realizado y proporcionado por el software *Match!* versión 2) están representados en azul los picos obtenidos de la muestra sintetizada y las líneas de color rojo los picos estándares de la hidroxiapatita [33]. Tal y como se puede ver, sí que concuerdan los picos, de manera que se puede concluir que el material sintetizado sí que es hidroxiapatita y se puede usar para mezclarlo con colágeno y generar los andamios.

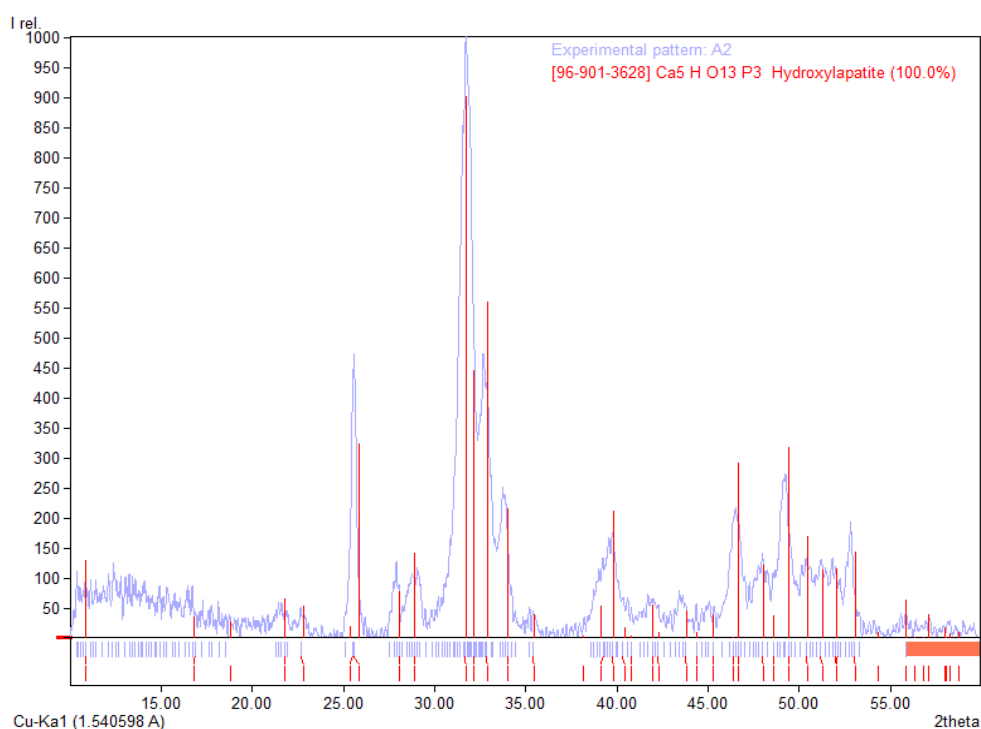


Figura 39. Caracterización XRD de las HANP

### 3.2.2. Caracterización de los andamios

Se ha estudiado la degradación y la capacidad de absorción del material con 8 andamios, analizando 4 el día 0 y los otros 4 al cabo de una semana, sumergidos en PBS a 37°C [42] (Figura 40). De forma que se puede estudiar las dos propiedades a dos tiempos diferentes.



Figura 40. Andamio sumergido en PBS

Para analizar la degradación del material, se pesan los andamios en una balanza antes y después de sumergirlos en PBS a 37 °C, habiendo sido previamente liofilizados.

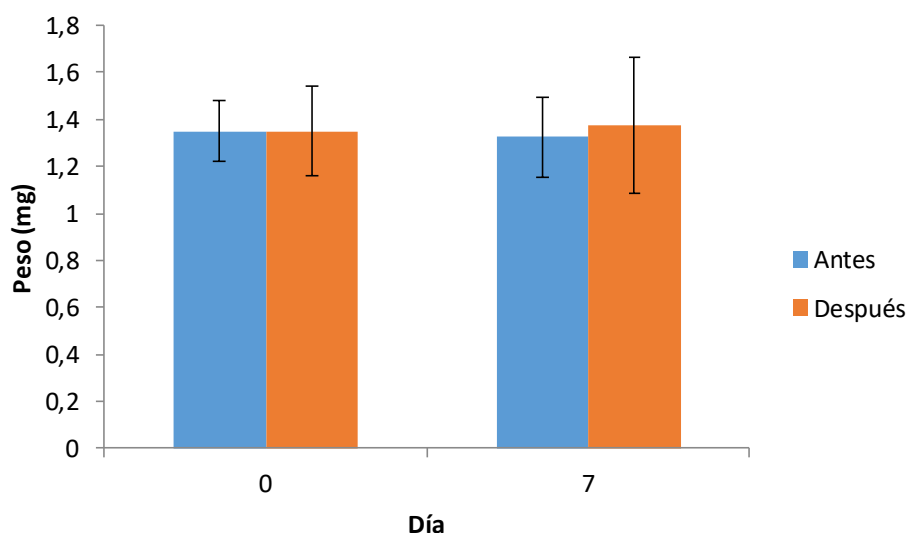


Figura 41. Comparativa del peso de los andamios del día 0 y 7, antes y después de sumergirlos en PBS a 37° C (liofilizados) para el estudio de su degradación.

Los resultados de la Figura 41 muestran que los andamios permanecen estables al inicio y al final de la semana, puesto que no hay una diferencia significativa entre los pesos.

La capacidad de adsorción, llamado *Swelling*, se estudia pesando los andamios en seco ( $W_d$ , antes de sumergirlos en PBS) y después de sumergirlos en PBS a 37 °C ( $W_s$ ) [24].

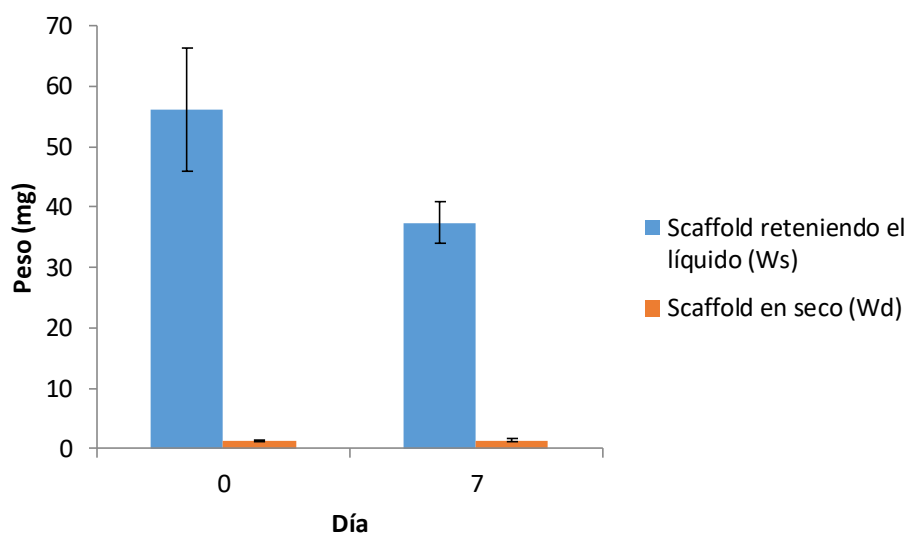


Figura 42. Comparativa del peso de los andamios del día 0 y 7, antes y después de sumergirlos en PBS a 37° C ( ) para el estudio de la capacidad de absorción.

Se observa en la Figura 42 que todos los andamios tienen la capacidad de retener líquido, que es justamente lo que se desea para poder sembrar las células en ellos.

Se calcula el porcentaje de la capacidad de adsorción mediante la siguiente ecuación [24]:

$$SW(\%) = [(W_s - W_d)/W_d] \cdot 100$$

En el cual:

$W_s$  = peso del material reteniendo el líquido

$W_d$  = peso en seco del material

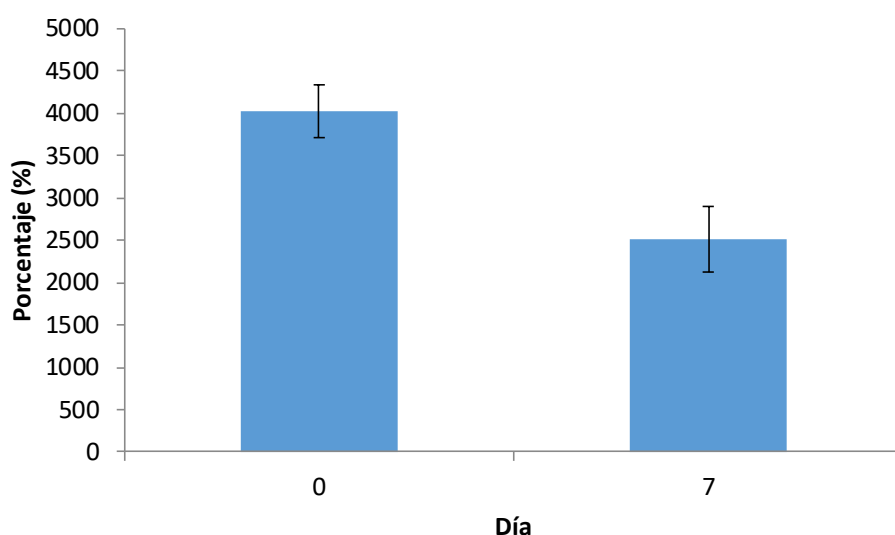


Figura 43. Capacidad de absorción en % de los andamios al inicio y al final de la semana

Según los resultados obtenidos en la Figura 43, la capacidad de absorción en % baja un poco en las muestras que fueron sumergidas en PBS a 37° C durante una semana comparados con los del día 0, pero no lo suficientemente como para que afecte posteriormente en la siembra de células o en el tratamiento de plasma en 3D.

### 3.2.3. Efecto del tratamiento de plasma en células cultivadas en 3D

Para poder determinar el efecto de los tratamientos en el ADN de los andamios con células cancerígenas es necesario realizar curvas de calibración que relacione la fluorescencia medida con el control, es decir, los andamios sin tratar. La Figura 44 corresponde a la curva de calibración construidas con las diluciones seriadas del ADN  $\lambda$  estándar.

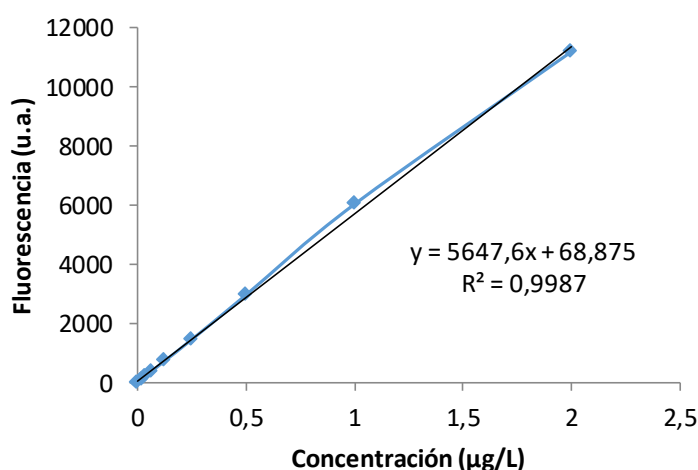


Figura 44. Curva de calibración de ADN  $\lambda$  estándar

La Figura 45 corresponde a los resultados obtenidos con el ensayo Picogreen.

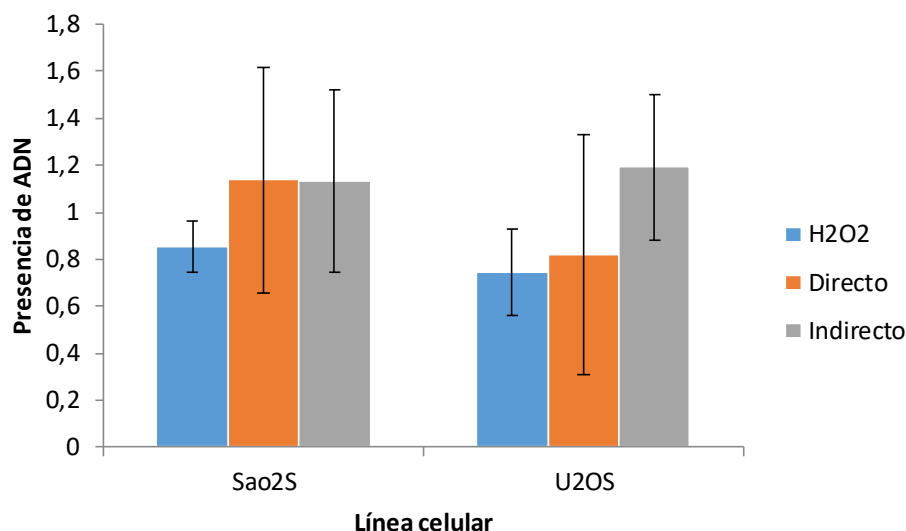


Figura 45. Cuantificación del ADN (relativo al control) en las dos líneas celulares sembradas en andamios (3D) con medio de cultivo DMEM con piruvato. Tratamiento directo e indirecto de plasma (10 mm distancia, flujo de Helio a 1L/min, 15min de tratamiento) y tratamiento con  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M), con 72 h de incubación.

En el tratamiento indirecto las células de las dos líneas proliferan ligeramente, y con el tratamiento directo las SaOS-2 también crecen.

Sólo en el caso del tratamiento directo con las U2OS hay un 20% de efecto (de manera genérica) sobre la proliferación celular (hay un 20% de ADN menos que en el control), y en la Figura 45 se puede apreciar que este % de efecto directo es similar al tratamiento con peróxido, aunque la desviación estándar es importante.

Puesto que el ensayo Picogreen es un análisis genético [35], sólo nos muestra la presencia de ADN en las muestras tratadas relativa al control, pudiendo estar induciendo muerte celular en el caso de las U2OS. Sería interesante realizar otro ensayo, como por ejemplo TUNEL [36], que detecta células apoptóticas que experimentan una degradación extensa del ADN durante las últimas etapas de la apoptosis; permitiría comprobar que el efecto generado es muerte celular.

## 4. Análisis del impacto ambiental

El Helio, el gas utilizado para los tratamientos de plasma atmosférico, no presenta ningún riesgo para el medio ambiente, y el APPJ no necesita de agentes químicos ni genera aguas residuales.

En el caso de los materiales sintetizados, la hidroxiapatita y los andamios de colágeno, ambos son biocompatibles y no contaminantes, por lo que el impacto ambiental es mínimo. El agua utilizada durante su proceso de síntesis es destilada, y tampoco supone un riesgo ambiental.

Los experimentos con tratamiento de plasma implican materiales de un solo uso tales como guantes, puntas, pipetas, placas... Pueden suponer uno de los impactos ambientales por constituir un riesgo para el medio ambiente. En cuanto a los reactivos químicos que se añaden para la cuantificación de RONS resultan peligrosos para el medio ambiente. Por estas razones en el laboratorio se establece un sistema muy estricto de separación de residuos, con diferentes contenedores adaptados a cada residuo y posteriormente se esteriliza, autoclava o trata dependiendo de su peligrosidad.

## Conclusiones

En este trabajo se ha podido estudiar el efecto directo e indirecto que produce el plasma a presión atmosférica en células sembradas en placas (2D) y en andamios (3D).

Se ha comprobado que el tiempo de tratamiento de plasma óptimo, el que corresponde con la máxima concentración de especies reactivas generadas, es de 15 min.

En 2D, con el estudio WST-1 de viabilidad celular, se observa que con 90s de tratamiento no hay ningún efecto significativo en las células, lo que puede explicarse por las bajas concentraciones de especies reactivas que se generan a tiempo tan corto en el medio de cultivo con piruvato empleado.

Empleando 15 min de tratamiento, el plasma indirecto tiene un efecto de proliferación sobre las células. En cambio con el tratamiento directo, sí que se induce muerte celular (efecto en un 30 % en la línea celular U2OS y un 40 % en las SaOS-2), en un porcentaje similar al tratamiento de peróxido de hidrógeno. Estas diferencias entre el tratamiento directo e indirecto pueden atribuirse al hecho que en tratamiento directo además de las RONS que se generan en el medio de cultivo, agentes como radiación electromagnética, UV y visible inciden sobre las células.

Se han desarrollado andamios de colágeno con nanopartículas de hidroxiapatita, con el objetivo de utilizarlos como andamios para el crecimiento celular y permitir la evaluación de los efectos del plasma en células de osteosarcoma sembradas en 3D, un entorno más similar al de un tumor real que un cultivo en 2D.

Mediante el estudio de degradación y capacidad de absorción del material, se ha podido comprobar que los andamios de colágeno incorporando hidroxiapatita sí son estables y tienen capacidad de absorción, permitiendo sembrar células en ellos para generar modelos tumorales tridimensionales y para evaluar los efectos del plasma atmosférico. A nivel celular, se ha mostrado que con el tratamiento directo del plasma hay una reducción de un 20 % de ADN en la línea celular U2OS.

Finalmente, se concluye que, comparado con el tratamiento indirecto en el cual las células tienden a proliferar, el directo tiene un cierto efecto citotóxico sobre las células; y como era de esperar, los efectos del plasma en 2D son más claros que en 3D. Puesto que en este proyecto se ha trabajado esencialmente en la puesta a punto de los andamios para los cultivos en 3D, estos resultados celulares preliminares deberán confirmarse con nuevos ensayos en el futuro.





## Presupuesto y/o Análisis Económico

En este apartado se incluye el coste aproximado para la realización del proyecto, tomando en consideración tres tipos de costes: material, maquinaria y personal.

**Tabla 4. Coste de los materiales**

Producto	Precio	Cantidad	Coste (€)
Agua destilada	15€/25L	3L	0,3
Colágeno	219€/bote	1 bote	219
Hidróxido de calcio	44,80€/500g	2,5g	0,22
Ácido fosfórico	119€/100mL	8mL	9,52
DMEM (1x) with sodium pyruvate	27,19€/500mL	1000mL	54,38
FBS	22€/50mL	100mL	44
Helio	250€/4000L	1 botella	250
Kit de ensayo WST-1	226€/kit	1 kit	226
Kit de ensayo Amplex Red	465€/kit	1 kit	465
Kit de ensayo PicoGreen	676€/kit	1 kit	676
Kit de ensayo Nitrito	475€/kit	1 kit	475
Sulfanilamida	42,25€/100g	0,5	0,21
NEED	68,10€/10g	0,05g	0,34
Solución de peróxido de hidrógeno 30%	99,50€/500mL	8mL	1,59
PBS	30€/500mL	40mL	2,4
Placa multipocillo de 6	153€/75placas	2 placas	4,08
Placa multipocillo de 12	178€/75placas	28 placas	66,45
Placa multipocillo de 96	40€/40placas	9 placas	9
Placa negra multipocillo de 96	262€/80placas	3 placas	9,8
Tiras reactivas H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	22,50€/paquete	1 paquete	22,5
Tiras reactivas NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	25€/paquete	1 paquete	25
Tripsina	38€/500mL	20mL	1,52
SaO2-S	350€	1	350
U2OS	350€	1	350
Otros (guantes, pipetas, puntas...)	250€	1	250
Coste total de los materiales	3512,31€		

Tabla 5. Coste total de las técnicas

Máquina	Precio	Cantidad	Coste (€)
Liofilizador	3€/muestra	5	15
Lector multi-modal de micro-placas	20€/h	2	40
Coste total de las técnicas empleadas	55€		

Tabla 6. Coste total del personal

Recurso	Precio/h (€)	Cantidad (h)	Coste (€)
Director de proyecto	60	40	2400
Investigador post-doctoral	30	40	1200
Estudiante de doctorado	30	20	600
Equipo técnico	30	3	90
Proyectista		400	0
Coste total de los recursos	4290€		

En resumen, el coste aproximado del proyecto es de 7857,31€.

## Bibliografia

- [1] P. Picci, L. Sangiorgi, P. Caldora, M. S. Benassi, M. Campanacci. *Histopatología del osteosarcoma*. Revista española de cirugía osteoarticular, 1995, vol. 30, n. 178: 211-216
- [2] Z. Taisoun. *Determination Of Protein in Her-2 Samples From Patients With Osteosarcoma*. 2012. DOI: 10.13140/RG.2.2.10774.14408
- [3] L. D. Muscolo, G. L. Farfalli, L. Germán, L. A. TINAIO, M. A. Ayerza. *Actualización en osteosarcoma*. Rev. Asoc. Argent. Ortop. Traumatol. 2009, vol. 74, n.1, p.86-101. ISSN 1852-7434
- [4] A. A. Lopez, Y. G. Lorenzo, A. P. Alvarez, M. G. Lorenzo. *Osteosarcoma: current approach*. AMC. 2010, vol.14, n.5. ISSN 1025-0255
- [5] L. Mirabello, R. J. Troisi, S. A. Savage. *Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004*. Cancer, 2009, 115: 1531-1543. DOI: 10.1002/cncr.24121
- [6] H. Conrads, M. Schmidt. *Plasma generation and plasma sources*, Plasma sources ci. Technol., 2000, vol. 9, n. 4, p. 441-454
- [7] S. Blackert, B. Haertel, K. Wende, T. Von Woedtke, U. Lindequist. *Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT)*. J. Dermatol. Sci., 2013, vol. 70, n.3, p. 173-181
- [8] John. *Science reflections and insights*. Plasma: the fourth state of matter, 2015
- [9] S. Wu, *Polymer interface and adhesion*, 1982, p. 299
- [10] L. Thévenart Brioux. *Tratamiento de hidrogeles biocompatibles con plasma atmosférico para la liberación de especies reactivas*, 2016.
- [11] L. V. Díaz Archundia. *Tratamiento de desechos mixtos por descargas de plasma térmico*, 2007.
- [12] F. J. Gordillo Vazquez, *Los plasmas fríos*. Investigación y Ciencia. 2008, p.70.79.
- [13] D. Iacocca, Á.B. Sifontes, M. Ropero, E.E. Ávila, *La tecnología de plasma en medicina*. Botica 2015, n. 32. ISSN 2443-4388

- [14] J. Heinlin, G. Isbary, W. Stolz, G. Morfill, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, T. Nosenko, J. L. Zimmermann, S. Karrer. *Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology*. 2010. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x
- [15] H. Masaru. *Plasma Medical science*. 2018
- [16] Q. Xiong, et al. *An Atmospheric Pressure Nonequilibrium Plasma Jet Device*. 2008, Vol. 36, núm. 4, p.986-987. ISSN 0093-3813. DOI: 10.1109/TPS.2008.926836
- [17] J. Schlegel, J. Köritzer, V. Boxhammer. *Plasma in cancer treatment*. Clinical Plasma Medicine, 2013, vol. 1, issue 2, p. 2-7, ISSN 2212-8166. DOI:10.1016/j.cpme.2013.08.001.
- [18] M. Laroussi, M. G. Kong, G. Morfill. *Plasma Medicine: Applications of Low-Temperature Gas Plasmas in Medicine and Biology*. Cambridge University Press, 2012
- [19] D. B. Graves. *The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology*. 2012, Vol. 45, núm. 5. ISSN 1361-6595
- [20] M. Keidar, A. Shashurin, O. Volotskova, M. A. Stepp, P. Srinivasan, A. Sandler, B. Trink. *Cold atmospheric plasma in cancer therapy*. Physics of plasmas 20, 2013, DOI: 10.1063/1.4801516
- [21] H. Kajiyama, M. Laroussi, F. Kikkawa. *Plasma Medical Innovation for Cancer Therapy*. Plasma Medical Science, 2018
- [22] M. V. García-Garduño, J. Reyes. *La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica*, Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2006, ISSN 1405-888X
- [23] C. Canal, R. Fontelo, I. Hamouda, J. G. Marti, U. Cvelbar, M. P. Ginebra. *Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death*. Free Radical Biology and Medicine. 2017, vol. 110, p. 72-80. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.023
- [24] G. Tronci, C. A. Grant, N. H. Thomson, S. J. Russell, D. J. Wood. *Multi-scale mechanical characterization of highly swollen photo-activated collagen hydrogels*. J. R. Soc. Interface 12, 2014. DOI: dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.1079
- [25] I. Hamouda, J. Guillem, M.P. Ginebra, C. Canal. *Liquids treated by Atmospheric Pressure Plasma Jet for bone cancer therapy*. Biomecánica, vol. 25, 2017, p. 7-15.

- [26] P. Maldonado, A. Gorbaney, Y. Dewilde, S. Smits, E. Bogaerts. *Reduction of Human Glioblastoma Spheroids Using Cold Atmospheric Plasma: The Combined Effect of Short-and Long-Lived Reactive Species*. Cancers. 2018. DOI: 10.394. 10.3390/cancers10110394
- [27] Molecular Probes, Inc. *Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*. Catálogo nº A22188, Invitrogen, 2009. <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp22188.pdf>
- [28] K. D. Weltmann, E. Kindel, W. T. Von, M. Hähnel, M. Stieber, R. Brandenburg. *Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine*, Pure Appl. Chem., 2010, vol. 82, n. 6, p. 1223-1237
- [29] G. Enriquez et al. *Molecular and Cellular Effects of Hydrogen Peroxide on Human Lung Cancer Cells: Potential Therapeutic Implications*. 2016
- [30] M. P. Ferraz, F. J. Monteiro, C. M. Manuel. *Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics; 2; 74-80; 2004.
- [31] J. J. El-Jawhari, C. S. Rodríguez, E. Jones, P. V. Giannoudis. *Collagen-containing scaffolds enhance attachment and proliferation of non-cultured bone marrow multipotential stromal cells*. Journal of Orthopedic Research, 2015, vol. 34, issue 4
- [32] Z. Zhao, M. Español, J. G. Martí, D. Kempf, A. D. Escudero, M. P. Ginebra. *Ion-doping as a strategy to modulate hydroxyapatite nanoparticle internalization*. Nanoscale Journal, issue 3, 2016
- [33] S. Shahabi et. Al. *Effect of Gamma Irradiation on structural and Biological Properties of a PLGA-PÊG-Hydroxyapatite Composite*. The scientific World Journal, 2014
- [34] D. Yan, J. H. Sherman, M. Keidar. *Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality*. Oncotarget. 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.13304
- [35] S. J. Ahn, J. Costa, J. R. Emanuel. *PicoGreen Quantitation of ADN: Effective Evaluation of samples Pre-or Psost-PCR*. Nucleic Acids Research, 1996, vol. 24, issue 13, p. 2623–2625, DOI: 10.1093/nar/24.13.2623
- [36] K. Kyrylkova, S. Kyryachenko, M. Leid, C. Kioussi. *Detection of apoptosis by TUNEL assay*. Methods Mol Biol. 2012, 887:41-7. DOI: 10.1007/978-1-61779-860-3\_5.
- [37] A. Riedl, M. chleder, K. Pudelfo, M. Stadler, S. Walter, D. Unterleuthner, C. Unger, N. Kramer, M. Hengstschl ger, L. Kenner, D. Pfeiffer, G. Krupitza, H. Dolznig. *Comparison of*

- cancer cells in 2D vs 3D culture reveals 2 differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses*. Cell Sci , 2017, 130: 203-218. DOI: 10.1242/jcs.188102
- [38] D. Lv, Z. Hu, L. Lu, H. Lu, X. Xu. *Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review)*. Oncology Letters 14.6, 2017, 6999-7010. ISSN 1792-1082. DOI: 10.3892/ol.2017.7134
- [39] N. K. Jang, S. E. Lee, S. R. Cha, C. H. Kim, H. K. Jeong, S. Y. Kim, J. H. Shin, J. E. Song, C. H. Park, G. Khang. *Osteogenic differentiation of bone marrow stem cell in silk fibroin scaffold*. Int J Tissue Reg. 2015,, 6:56-63.
- [40] Y. Kook, D. Lee, J. song, N. Tripathy, Y. Jeon, H. Jeon, J. M. Oliveira, R. L. Reis, G. Khang. *Osteogenesis evaluation of duck's feet-derived collagen/hydroxyapatite sponges immersed in dexamethasone*. Biomaterials Reseach. 2017, 21:2 DOI: 10.1186/s40824-017-0088-4
- [41] Y. Farhat. *PicoGreen Cell Proliferation Assay Protocol*. Simplify Science, Protocol Place, 2012.
- [42] I. Sandonis. *Andamios Porosos*. Tesis doctoral 2015.

## Anexos

### Protocolos

#### Reactivos

##### Anexo 1 – Amplex Red/HRP

El kit consta de los siguientes componentes:

- Reactivo Amplex Red (MW = 257,25 g/mol; 154 µg/vial, en total hay 5 viales)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (700 µL)
- 5X Buffer (28 mL de 0,25 fosfato de sodio, pH 7,4)
- Peroxidasa de rábano (HRP) (10U)
- Solución al 3% de peróxido de hidrógeno (MW = 34,01 g/mol; 200 µl)

El kit debe ser almacenado a – 20 °C y protegido de la luz.

Se extrae el kit del congelador y se deja el vial del reactivo Amplex Red y DMSO a temperatura ambiente. Se añaden 4 mL del 5X Buffer en 16 mL de agua desionizada para obtener 20 mL de solución 1X Buffer. Se disuelve el contenido del vial de HRP en 1 mL de 1X Buffer para obtener 10 U/mL de HRP.

Justo antes de usar el Amplex Red, se disuelve el contenido de su vial en 60 µL de DMSO, para obtener 10 mM del reactivo Amplex Red. Se mezclan 4,85 mL de 1X Buffer con 100 µL de HRP más los 50 µL de la solución de Amplex Red recién preparada, y se obtienen 5 mL de la solución de trabajo (reactivo Amplex Red/HRP).

##### Anexo 2 – Griess

Material necesario para preparar el reactivo Griess:

- Agua destilada
- Ácido orto-fosfórico (ref: 141032.1211, 85% pureza, Panreac, Estados Unidos)
- Sulfanilamida (ref: S9251-100G, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- N-(1-(Naphthyl)etylenediamine dihydrochloride) (NEED) (ref: 222488-10G, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

Para preparar 50 mL de reactivo Griess se mezcla en un vaso de precipitados agua destilada con 0,5 g de sulfanilamida y 0,05 g de NEED. Posteriormente se le añaden 1,15 mL de ácido fosfórico al 85% y se trasvasa a un matraz aforado de volumen 50 mL y se enrasa con agua destilada. Se cubre el matraz con papel de aluminio para proteger la solución de la luz.

## Curvas de calibración

### Anexo 3 – $H_2O_2$

El medio de cultivo contiene en sí cierta cantidad de peróxidos, es por ese motivo que para realizar la curva de calibración de los peróxidos hay que hacer las diluciones en Buffer, para evitar interferencias con la señal (y evitar la saturación).

Se diluyen 22,7  $\mu$ L de ~3%  $H_2O_2$  en 977  $\mu$ L de 1X Buffer. Esta solución equivale a una concentración de 20 mM de  $H_2O_2$  el cual designaremos como solución madre.

Se construye la curva de calibración del  $H_2O_2$  preparando la dilución seriada de la Tabla 7.

Tabla 7. Dilución seriada para la curva de calibración de fluorescencia  $H_2O_2$

Solución	Concentración ( $\mu$ M)	Volumen 1X Buffer ( $\mu$ L)	Volumen solución
1	20	999	+1 $\mu$ L solución madre
2	10	500	+500 $\mu$ L solución 1
3	5	500	+500 $\mu$ L solución 2
4	2,5	500	+500 $\mu$ L solución 3
5	1,25	500	+500 $\mu$ L solución 4
6	0,625	500	+500 $\mu$ L solución 5
7	0,3125	500	+500 $\mu$ L solución 6
8	0	500	



**Anexo 4 –  $\text{NO}_2^-$** 

Primero se preparan las soluciones para crear la curva de calibración del  $\text{NO}_2^-$ . La solución madre es el vial que contiene nitrito a una concentración de 14 mM. Se preparan 10 Eppendorfs, y a partir de la solución madre, se diluye en medio DMEM, obteniendo las diluciones seriadas de la Tabla 8.

**Tabla 8. Dilución seriada para la curva de calibración de absorbancia  $\text{NO}_2^-$**

Solución	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Volumen DMEM ( $\mu\text{L}$ )	Volumen solución
1	140	990	+10 $\mu\text{L}$ solución madre
2	70	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 1
3	35	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 2
4	17,5	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 3
5	8,75	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 4
6	4,375	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 5
7	2,1875	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 6
8	1,09375	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 7
9	0,546	500	+500 $\mu\text{L}$ solución 8
10	0	500	

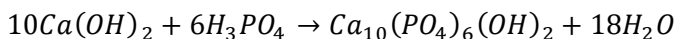
**Síntesis de HANP y andamios****Anexo 5 – Cálculos para la preparación de hidróxido de calcio y ácido fosfórico**

Material necesario para la síntesis de HANP:

- ✓ Ácido orto-fosfórico (ref: 141032.1211, 85% pureza, 14,6M, Panreac, Estados Unidos)
- ✓ Hidróxido de calcio (ref: C-7887, 95% pureza, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

Las HANP son sintetizadas por la neutralización del hidróxido de calcio con ácido fosfórico a 40 °C de temperatura en el aire, dando como resultado la siguiente reacción química:





Para obtener 1,67 de radio molar estequiométrico Ca/P, se necesita 0,2 M de ácido fosfórico:

$$0,334\text{M Ca}^{2+} \text{ en } 0,2\text{M H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \frac{0,334\text{M Ca}^{2+}}{0,2\text{M H}_3\text{PO}_4} = 1,67 \text{ Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$$

En cada síntesis se usan 100 mL de solución de ácido fosfórico 0,2 M, pero en la primera se preparan 500mL para poder usarla en síntesis posteriores.

$$c_o v_o = c_f v_f$$

$$14,6 \text{ M} \cdot v_o = 0,2 \text{ M} \cdot 500 \text{ mL} \rightarrow v_o = \mathbf{6,85 \text{ mL}}$$

Esta se prepara dentro de la campana. Se llena un frasco de vidrio con 500 mL de agua destilada y con una pipeta de 5 mL se quitan 6,85 mL de agua. Con otra pipeta se cogen 6,85 mL de ácido fosfórico y se transfieren al frasco. La solución de ácido fosfórico 0,2 M ya está preparada y se puede dejar a parte.

Se calcula la cantidad de hidróxido de calcio necesaria:

$$100 \text{ mL} \cdot \frac{0,334 \text{ mol Ca}^{2+}}{1000 \text{ mL}} \cdot \frac{1 \text{ mol Ca}(\text{OH})_2}{1 \text{ mol Ca}^{2+}} \cdot \frac{74,10 \text{ g}}{1 \text{ mol Ca}(\text{OH})_2} = \mathbf{2,475 \text{ g Ca}(\text{OH})_2}$$

## Anexo 6 – Dispersión de las HANP

Se prepara la solución de suspensión de las HANP al 5%. En una balanza se pesan 0,5 g de nanopartículas de hidroxiapatita y 0,5 g de citrato de sodio tribásico y se dejan en un tubo Falcon de 15 mL. Se le añade a la mezcla 10 mL de agua destilada y se remueve un poco.

En un vaso precipitado se pone el tubo con la solución en medio con cubos de hielo alrededor para dejarlo en el sonicador y resuspender las nanopartículas, ajustando la siguiente configuración de sonicación:

- Amplitud = 40%
- Tiempo = 2 min
- 10s ON y 10s OFF (sonicación y descanso)

Al acabar, se extrae el tubo y se deja el vaso precipitado dentro del sonicador para hacer la limpieza, configurando:

- Amplitud = 20%
- Tiempo = 30s

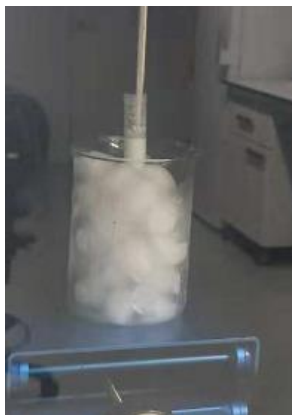


Figura 46. HANP en el sonicador

### Anexo 7 – Cálculos de la composición de los andamios

El material utilizado es el siguiente:

- ✓ Solución de las HANP dispersas (Anexo 6)
- ✓ Colágeno (type I, ref: C3867-1VL, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

Se usa la tapa del Eppendorf como molde, y esta es de 200 $\mu$ L de volumen. Para el experimento se necesitan 24 esponjas, pero se hacen unas cuantas más por si acaso. Por lo cual para generar 30 andamios de colágeno se necesitan 7 mL de la solución total (colágeno con nanopartículas de hidroxiapatita):

$$200\mu L \cdot 30 \text{ scaffolds} = 6000\mu L = 6\text{mL} \sim 7\text{mL}$$

Y se calcula el volumen de la solución de nanopartículas de hidroxiapatita (HANP) necesario para generar esponjas de colágeno con 0,5% de HANP:

$$5\% \cdot V = 0,5\% \cdot 7\text{mL} \rightarrow V = 0,7\text{mL} = 700\mu L \text{ HANP}$$

Con lo cual:

$$7000\mu L \text{ total} - 700\mu L \text{ HANP} = 6300\mu L \text{ colágeno}$$

Se necesitan 6300 µL de colágeno. Se saca el bote de colágeno del frigorífico y se pone en un recipiente con cubos de hielo. Es importante ya que si está a temperatura ambiente la proteína se puede degradar.

En otro tubo Falcon de 50 mL, utilizando la pipeta de 1000, se le ponen los 6300 µL de colágeno y luego se le añaden los 700 µL de la solución HA. Se agita el tubo y se remueve un poco.

### Anexo 8 – Solución de entrecruzamiento

Se prepara la solución para entrecruzar (*X-link*) los andamios, en 95% de **etanol** con 33 mM de *1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)* y 6 mM de N-hydroxysuccinimide (**NHS**).

El volumen de la solución total a preparar es:

$$30 \text{ scaffolds} \cdot 2\text{mL}^* = 60 \text{ mL} \sim 70 \text{ mL}$$

\*2mL es el volumen a trabajar en una placa multipocillo de 24.

Dando lugar a:

$$70 \text{ mL } 95\% \text{ etanol} + 434 \text{ mg EDC} + 47,6 \text{ mg NHS}$$

En primer lugar se prepara el etanol en un tubo Falcon de 50 mL. Se ponen 66,5 mL de etanol puro y se le añaden 3,5 mL de agua destilada.

En segundo lugar se preparan los agentes de entrecruzamiento. Se coge el NHS del desecador y el EDC del congelador, se pesan en una balanza y se dejan en otro tubo Falcon de 50 mL.

### Anexo 9 – Solución de digestión

Componentes necesarios:

- ✓ Papaína (ref: P4762-25MG, Sigma-Aldrich)
- ✓ L-cisteína (ref: C1276-10G, Sigma-Aldrich)
- ✓ EDTA (ref: E6511, Sigma-Aldrich)
- ✓ DPBS (ref: 14190, Gibco)

Para preparar 30 mL de solución de digestión se mezclan:

- 29,16 mL de DPBS
- 375 µL de papaína (125 µg/L)

- 300 µL de L-cisteína (2 mM)
- 180,18 µL de EDTA (0,333 M)

#### Anexo 10 – Curva de calibración de ADN $\lambda$ estándar

Se diluyen 8 µL de ADN  $\lambda$  estándar en 392 µL de 1X TE Buffer. Esta es la solución madre, que equivale a una concentración de 2 µg/L.

A partir de la solución madre, se consigue la solución seriada de la Tabla 9:

Tabla 9. Curva de calibración de ADN estándar

Solución	Concentración (µg/L)	Volumen 1X Buffer (µL)	Volumen solución
1	1	200	+200 µL solución madre
2	0,5	200	+200 µL solución 1
3	0,5	200	+200 µL solución 2
4	0,25	200	+200 µL solución 3
5	0,125	200	+200 µL solución 4
6	0,0625	200	+200 µL solución 5
7	0,03125	200	+200 µL solución 6
8	0	200	

## Anexo 11 – Gráficas de las muestras con cuatro réplicas

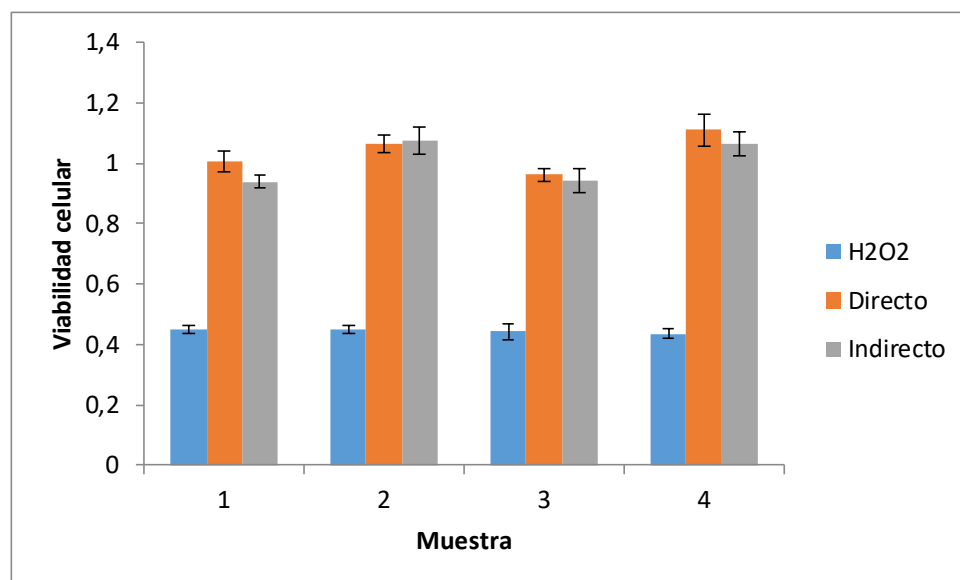


Figura 47. Línea celular SaOS-2 tratadas con plasma durante 90s después de un periodo de 24h de incubación

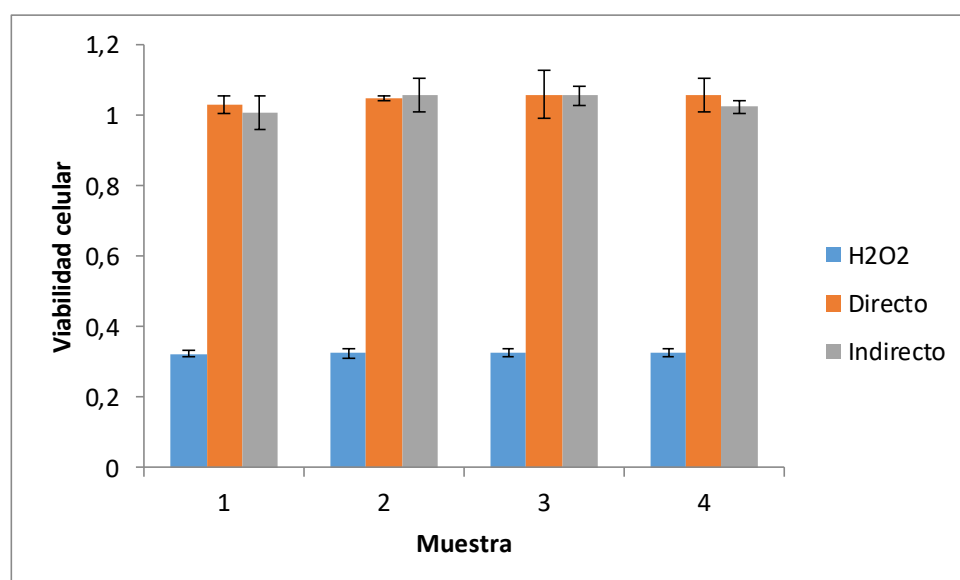


Figura 48. Línea celular SaOS-2 tratadas con plasma durante 90s después de un periodo de 48h de incubación

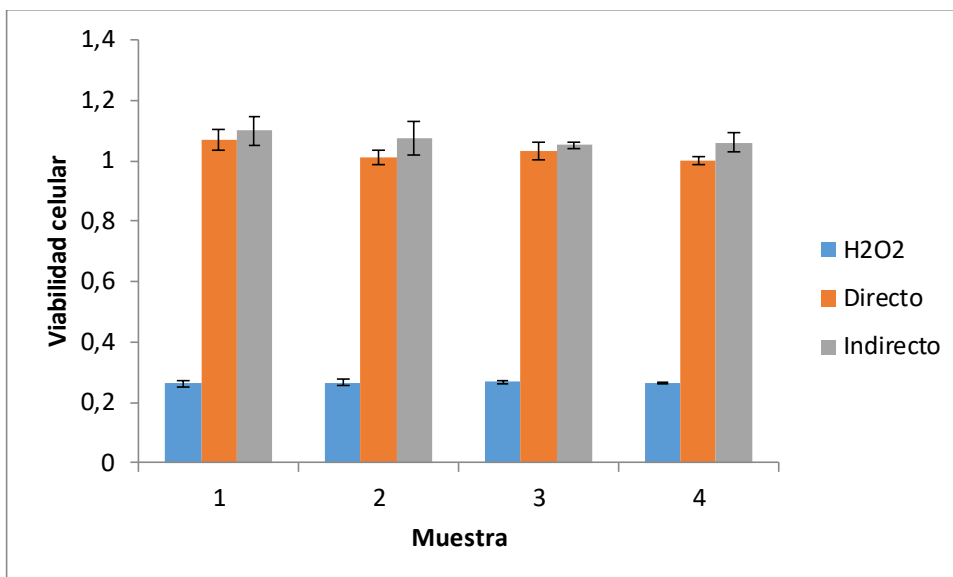


Figura 49. Línea celular SaOS-2 tratadas con plasma durante 90s después de un periodo de 72h de incubación

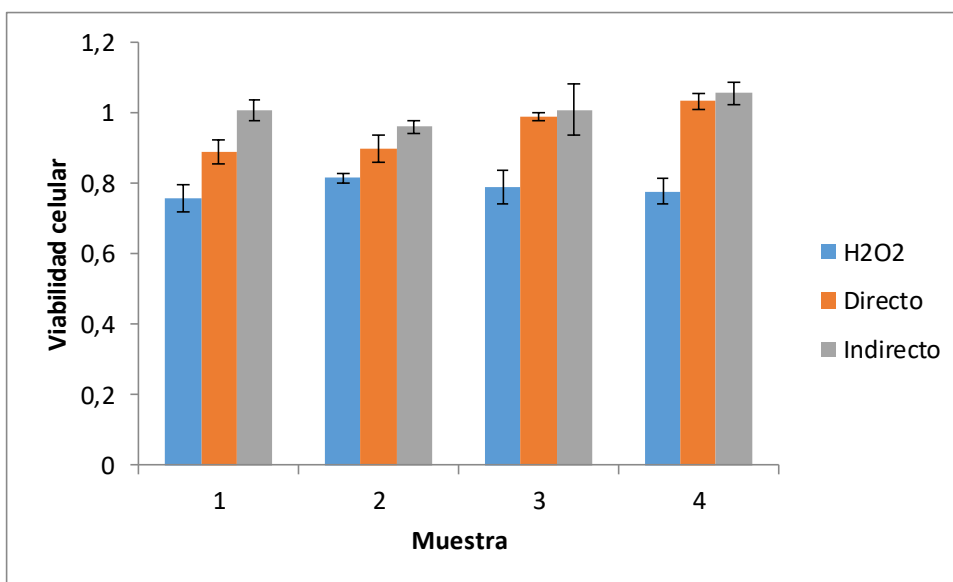


Figura 50. Línea celular U2OS tratadas con plasma durante 90s después de un periodo de 24h de incubación

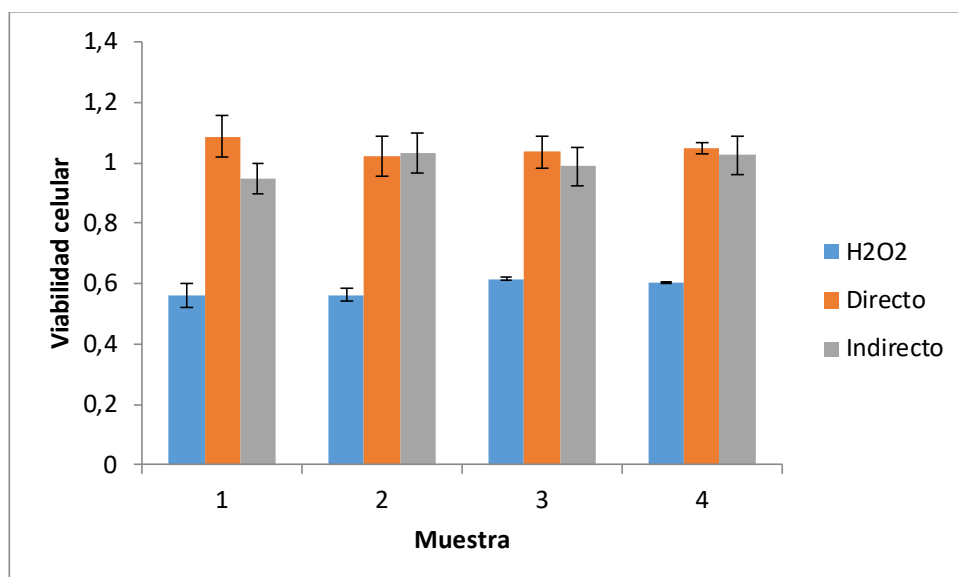


Figura 51. Línea celular U2OS tratadas con plasma durante 90s después de un periodo de 48h de incubación

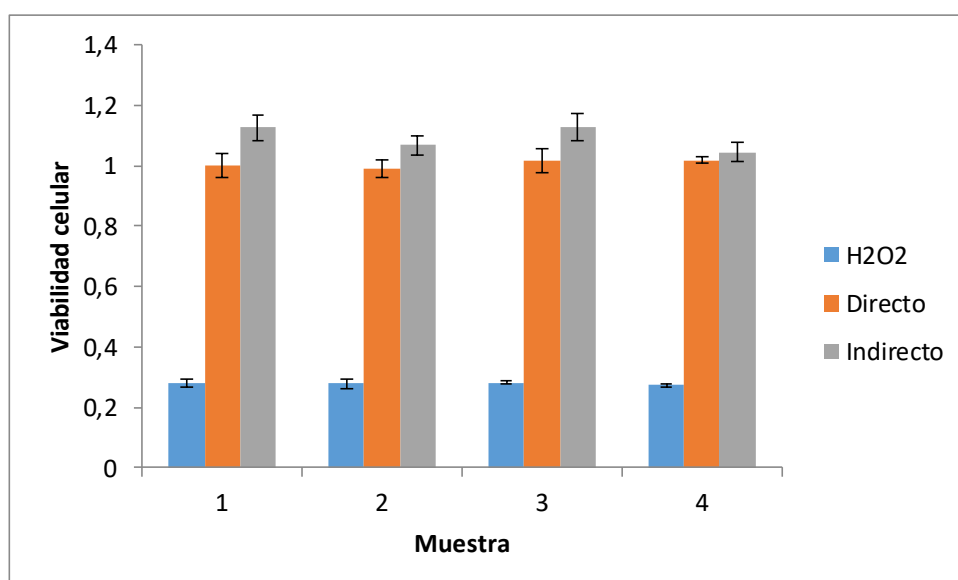


Figura 52. Línea celular U2OS tratadas con plasma durante 90s después de un periodo de 72h de incubación



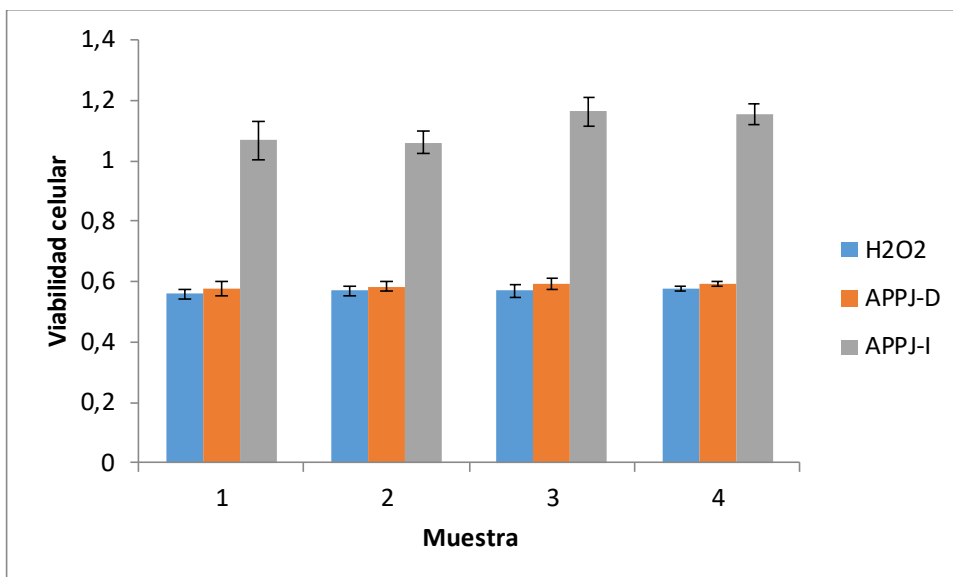


Figura 53. Línea celular SaOS-2 tratadas con plasma durante 15min después de un periodo de 72h de incubación

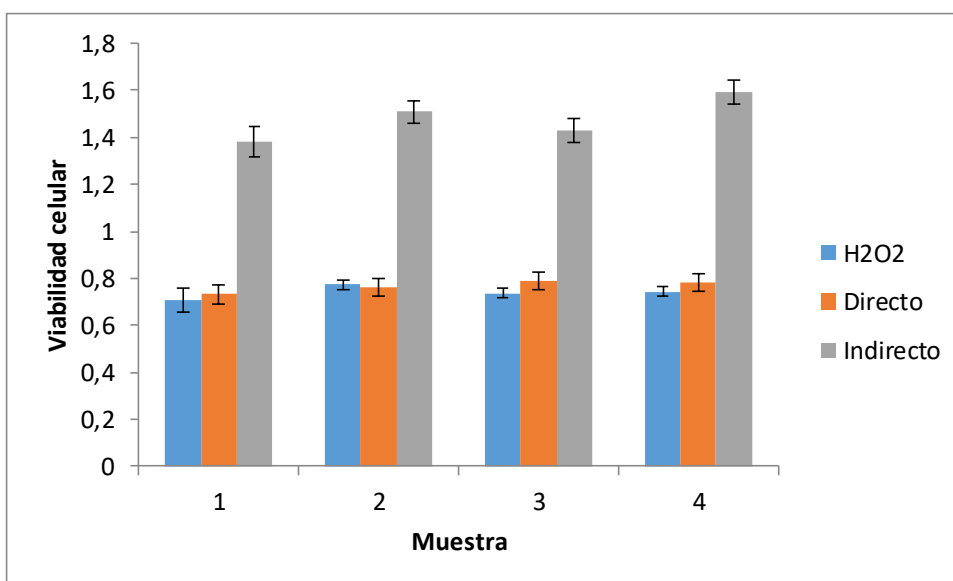


Figura 54. Línea celular U2OS tratadas con plasma durante 15min después de un periodo de 72h de incubación